



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C12N 5/10, A61K 35/48, C07K 16/18, G01N 33/50	A1	(11) International Publication Number: WO 97/28255 (43) International Publication Date: 7 August 1997 (07.08.97)
(21) International Application Number: PCT/US97/01430 (22) International Filing Date: 30 January 1997 (30.01.97) (30) Priority Data: 60/011,042 2 February 1996 (02.02.96) US (60) Parent Application or Grant (63) Related by Continuation US 60/011,042 (CIP) Filed on 2 February 1996 (02.02.96) (71) Applicant (for all designated States except US): THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES [US/US]; Office of Technology Transfer, National Institutes of Health, Suite 325, 6011 Executive Boulevard, Rockville, MD 20852 (US). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): TOPALIAN, Suzanne, L. [US/US]; 19400 James Creek Court, Brookeville, MD 20833 (US). LINEHAN, W., Marston [US/US]; 7009 Tilden Lane, North Bethesda, MD 20852 (US). BRIGHT, Robert, K. [US/US]; 14163 Furlong Way, Germantown, MD 20874	(US). VOCKE, Cathy, D. [US/US]; 20533 Golf Course Drive, Germantown, MD 20874 (US). (74) Agents: FEILER, William, S. et al.; Morgan & Finnegan, L.L.P., 345 Park Avenue, New York, NY 10154 (US). (81) Designated States: CA, JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>	
(54) Title: IMMORTAL HUMAN PROSTATE EPITHELIAL CELL LINES AND CLONES AND THEIR APPLICATIONS IN THE RESEARCH AND THERAPY OF PROSTATE CANCER		
(57) Abstract <p>The present invention relates to immortalized, malignant, human, adult prostate epithelial cell lines or cell lines derived therefrom useful in the diagnosis and treatment of prostate cancer. More particularly, the present invention relates to cloned, immortalized, malignant, human, adult prostate epithelial cell lines and uses of these cell lines for the diagnosis and treatment of cancer. Furthermore, the present invention provides for the characterization of said cell lines through the analysis of specific chromosomal deletions.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

* NOTICES *

IPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

Claim(s)]

1. Malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock by which immortalization was isolated and carried out.
2. Malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock which is characterized by having at least one allele deletion of heterozygote nature and with which immortalization of claim 1 was carried out.
3. Malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock with which allele deletion exists in one or chromosome beyond it and with which immortalization of claim 2 was carried out.
4. Malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock which is chosen from group which chromosome becomes from chromosome 1, chromosome 8, chromosome 10, chromosomes 16, and those combination and with which immortalization of claim 3 was carried out.
5. Malignant Homo sapiens prostate gland epithelial cell stock with which allele deletion exists on chromosome 8p and with which immortalization of claim 2 was carried out.
6. Malignant Homo sapiens prostate gland epithelial cell stock with which allele deletion exists on chromosome 8p11-21 and with which immortalization of claim 2 was carried out.
7. Malignant Homo sapiens prostate gland epithelial cell stock with which allele deletion exists in one or more seats and with which immortalization of claim 2 was carried out.
8. Malignant cell stock which is chosen from group which deletion becomes from SFTP-2, D8S133, D8S136, D8S131, NEFL, D8S137, D8S339, ANK, and those combination and with which immortalization of claim 6 was carried out.
9. It is ATCC to ATCC. Malignant prostate gland epithelial cell stock [by which immortalization was cloned and carried out] which was deposited as CRL-12263, by which immortalization was cloned and carried out, which has the identification property of malignant prostate gland epithelial cell stock 1535-CP1TX.14.3.
10. It is ATCC to ATCC. Malignant prostate gland epithelial cell stock which has the identification property of malignant prostate gland epithelial cell stock 1542-CP3TX.8.4 which was deposited as CRL-12264, and by which immortalization was cloned and carried out and by which immortalization was cloned and carried out.
11. It is ATCC to ATCC. Malignant prostate gland epithelial cell stock which has the identification property of malignant prostate gland epithelial cell stock 1542-CP3TX.8.1 which was deposited as CRL-12265, and by which immortalization was cloned and carried out and by which immortalization was cloned and carried out.
12. It is ATCC to ATCC. Malignant prostate gland epithelial cell stock 1535-CP1TX.14.3 which were deposited as CRL-12263 and by which immortalization was cloned and carried out.
13. It is ATCC to ATCC. Malignant prostate gland epithelial cell stock 1542-CP3TX.8.4 which were deposited as CRL-12264 and by which immortalization was cloned and carried out.
14. It is ATCC to ATCC. Malignant prostate gland epithelial cell stock 1542-CP3TX.8.1 which were deposited as CRL-12265 and by which immortalization was cloned and carried out.
15. It is ATCC to ATCC. Malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock 1532-CP2TX which was deposited as CRL-12038 and by which immortalization was carried out.
16. It is ATCC to ATCC. Malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock 1535-CP1TX which was deposited as CRL-12041 and by which immortalization was carried out.
17. It is ATCC to ATCC. Malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock 1542-CP3TX which was deposited as CRL-12037 and by which immortalization was carried out.
18. Isolate Epithelial Cell from A. Primary Prostate Gland Neoplasm, and Start Cell Culture. B. Immortalization of this prostate gland epithelial cell is carried out. C. The single cell of the malignant adult prostate gland epithelial

- cell stock which carried out immortalization Cronin GU D. It is heterozygote nature about a malignant prostate gland epithelial cell or a clone. Malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock which is manufactured by the approach of consisting of what it analyzes whether it has at least one allele deletion for and by which immortalization was cloned and carried out.
19. The malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock which allele deletion produces on chromosomes 1, 8, 10, and 16 or the combination of those and by which claim 18 was cloned and immortalization was carried out.
20. Normal Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock 1532-NPTX which was deposited with ATCC as CRL-12036 and by which immortalization was carried out.
21. Normal Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock 1535-NPTX which was deposited with ATCC as CRL-12039 and by which immortalization was carried out.
22. Normal Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock 1542-NPTX which was deposited with ATCC as CRL-12040 and by which immortalization was carried out.
23. the malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell carried out A immortalization -- and -- Constituent containing a normal Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell with which immortalization of the self-origin was carried out.
24. The constituent of claim 23 by which immortalization was carried out and whose normal Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock with which immortalization of the self-origin was carried out it is 1532-CP2TX by which the malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock was deposited with ATCC as CRL-2038, and is 1532-NPTX deposited with ATCC as CRL-12036.
25. The constituent of claim 23 by which immortalization was carried out and whose normal Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock with which immortalization of the self-origin was carried out it is 1535-CP1TX by which the malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock was deposited with ATCC as CRL-2041, and is 1535-NPTX deposited with ATCC as CRL-12039.
26. The constituent of claim 23 by which immortalization was carried out and whose normal Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock with which immortalization of the self-origin was carried out it is 1542-CP3TX by which the malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock was deposited with ATCC as CRL-2037, and is 1542-NPTX deposited with ATCC as CRL-12040.
27. The Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock with which immortalization of claim 1 thru/or 22 was carried out, its clone or its part, and the drugs constituent that comes to contain the support permitted pharmacologically.
28. Drugs constituent of claim 27 which includes an assistant, a costimulatory molecule, cytokine, a chemokine, adhesion molecules, MHC molecules, or those combination further.
29. Immunogen for inducing a specific immune response into the prostatic cancer protein containing the part of the Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock with which immortalization of claim 1 thru/or 20 was carried out, its clone, or its immunogenicity, or its part.
30. Immunogen of claim 29 which includes an assistant, a costimulatory molecule, cytokine, a chemokine, adhesion molecules, MHC molecules, or those combination further.
31. Immunogen of claim 29 whose immune response is a cell mediation response.
32. Immunogen of claim 29 whose immune response is a humoral response.
33. The antibody which has immunoreactivity in the immunogen of claim 29.
34. The malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock with which immortalization of claim 1 thru/or 22 was carried out, its clone, or the prostatic cancer vaccine which comes to contain the part.
35. Prostatic cancer vaccine of claim 34 which consists of more than one or it of the gene which carries out the code of cytokine, a chemokine, a costimulatory molecule, adhesion molecules, or the MHC molecule being further included in this cell.
36. The screening approach of the therapy agent candidate who exposes the adult prostate gland epithelial cell stock with which immortalization of claim 1 thru/or 22 was carried out to ** which should be examined, and consists of evaluating the effectiveness over this cell of this **.
37. The approach of claim 36 that effectiveness is cytotoxicity.
38. The approach of claim 36 that effectiveness is control of cell proliferation.
39. The kit of the adult prostate gland epithelial cell stock with which immortalization of claim 1 thru/or 22 was carried out which contains a kind at least.
40. the normal cell strain carried out A immortalization -- and -- B -- kit containing the malignant cell stock with
- http://www4.ipdl.ncipi.go.jp/cgi-bin/tran_web.cgi_ejje?u=http%3A%2F%2Fwww4.ipdl.ncipi.go.jp%2FTokuji... 8/22/2006

which immortalization of the same individual origin was carried out of claim 39.

11. the Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock carried out A. immortalization -- unicellular cloning carrying out -- and -- B. -- malignant Homo sapiens adult prostate gland top by which immortalization was carried out to at least one chromosome Allele of at least one heterozygosity which is the index of a hide cell The approach of choosing from a source of supply the malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock by which immortalization was carried out which consists of what the cell which has deletion is chosen for.

12. The approach of claim 41 that a source of supply is the cell culture object of a prostate gland cell.

13. The approach of claim 41 chosen from the group which a chromosome becomes from 1, 8, 10, 16, and those combination.

14. The approach of claim 43 that a chromosome is 8p.

15. The approach of claim 44 that deletion exists on at least one allele chosen from a field eight p11-21.

Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

Field of application invention to the cell strain of a Homo sapiens prostate gland epithelium non-dead cell, clones, those researches, and prostate gland cancer treatment This invention relates to the malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock by which immortalization was carried out. This invention relates also to each cell clone of those cell strains again. This invention relates also to the malignant cell strain and malignant clone of a Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell which were further characterized in the analysis of loss of allele heterozygosity and by which immortalization was carried out. Especially this invention relates to the application to the cell strain of the normal of a private organization, and a malignant prostate gland epithelial cell, clones, and those researches. This invention relates also to use of the cell in a diagnosis and therapy of a prostatic cancer again.

Background of invention That it is difficult to establish a long-term Homo sapiens prostate gland cancer cell stock by in vitro has checked the advance towards development of the new cure to an understanding and prostatic cancer of prostate gland tumorigenesis. The foundation over the great portion of experiment in the living body about the things biological and like a molecule for which only four prostate gland cancer cell stocks generated from transition damage till today are controlling prostate gland tumorigenesis has been offered. Therefore, that ***** before a long period of time is established has the scientific, diagnostic, and big need in therapy. In recent years, a prostatic cancer is the cancer by which a general diagnosis is most carried out in an American male.

* will also have estimated a new prostatic cancer only this year, if about 300,000 affairs and 40,000 affairs or more have died, and the case fatality rate of cancer has ranked 2nd following lung cancer (1). Although the death by the prostatic cancer originates in the mainly transferred disease, it has the primary tumor which carried out localization about 60% of the patient diagnosed newly. In many cases, the metastatic disease spread to the disease which carried out localization although a surgical operation and radiation therapy were often effective cannot be treated. In spite of every scientific effort, it is known about the biological matter which causes generating and advance of a prostatic cancer whether it is comparatively small. The improvement of an understanding to the cell and the matter like a molecule which participate in formation of a primary prostatic cancer and advance of the transition is required for development of the new policy for the therapy of a prostatic cancer.

Four Homo sapiens prostate gland cancer cell stocks (LNCaP, DU145, PC-3, TSU-Pr1) generated from the damage on metastatic have offered the base of an experiment in the living body about most prostatic cancers. The big advance for cultivating a short-term cell strain out of a living body from a primary (non-metastatic) prostatic cancer was made. Those advances include amelioration of development of *****, preparation of a fresh organization, and the culture technique of a prostate gland epithelial cell (3 4). However, establishment and its maintenance of the long-term Homo sapiens prostate gland epithelial cell stock of the primary tumor origin were impossible unless immortalization in the outside of a living body was made. Therefore, the reports which indicated the long-term cell strain which carried out immortalization are few, and they were restricted to culture of a normal prostate gland epithelium (5, 6, 7, 8). Therefore, the target of this research was establishing an approach it being for generating the prostate gland cancer cell stock originating in a primary tumor divided permanently] reliable. Furthermore, it is a problem accompanying distinguishing a normal epithelial cell and the cultivated prostate gland cancer cell for a proper to be difficult for establishment of a non-death prostate gland epithelial cell stock. It was shown clearly that most cell strains produced from the prostatic cancer which carried out localization by the cytogenetics-estimate of the past about two or more short-term prostate gland epithelium cultured cells showed normal man's karyotype (9, 10, 11). the microscope gestalt of a short-term-culture cell not being [this]

remarkable and a xenograft are perfect -- it united that it was unsuccessful and identification and characterization of a Homo sapiens primary prostate gland cancer cell were made difficult for the degree of pole.

It is believed that generating of a prostatic cancer takes place as a result of two or more intracellular hereditary change containing the inactivation of the potential antioncogene which appears by the deletion of allele (it explains to 12). The early research which investigated the deletion in a fresh (not cultivated) primary prostatic cancer sample shows disappearance (allelic loss of heterozygosity, LOH) of the allele heterozygosity on chromosome 10q and 16q (13, 14, 15). It is shown that the research following it has disappearance of allele by notably high frequency on a No. 8 chromosome short arm, therefore chromosome 8p has become the high order of the list of candidates of the location of the neoplasm inhibitor relevant to a prostatic cancer (16, 17, 18). Furthermore, the investigation of LOH on the short arm of chromosome 8p about the PIN damage (20) by which minute excision of the neoplasm (19) by which minute excision of 99 of recent years was carried out, and 54 was carried out showed a powerful proof of inactivation of the neoplasm inhibitor on chromosome 8p12 -21 (group) compared with the normal corresponding control group. Therefore, it can become a powerful alternative way for identification of the Homo sapiens prostate gland epithelial cell stock originating in a primary tumor, and characterization to investigate LOH in this small deletion field on chromosome 8p12 -21.

This inventions are two or more success and characteristic genetic analyses of generation of a human tumor cell stock originating in a primary prostate gland neoplasm.

Outline of invention This invention offers isolation of the long-term Homo sapiens epithelial cell stock originating in neoplasm nature and normal prostatic glandular tissue, immortalization, analysis, research of these cell strains, and the application in prostate gland cancer treatment. Especially the purpose of this invention was attained using the prostate gland epithelial cell stock with the reproductive integrity originating in both malignant and benign private samples.

The cell strain of this invention is useful as a model of epithelial cell tumorigenesis. For example, especially the prostate gland epithelial cell stock in which this invention carried out immortalization is useful because of an understanding of the tumorigenesis of a prostatic cancer. It offers using this invention as a reagent for investigating the role of the heredity in determining the genetic occurrence which causes change to malignant cell phenotype [good nature] with the malignant adult prostate gland cell strain of the own house nature which carried out immortalization of the benign adult prostate gland cell strain which carried out immortalization, and a prostatic cancer.

This invention is the isolated malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock which carried out immortalization. Another side face of this invention is the cloned malignant adult prostate gland epithelial cell stock with disappearance (LOH) of at least one allele heterozygosity which was characterized as a thing and which carried out immortalization. The further side face of this invention is the cloned malignant Homo sapiens adult prostate gland cell strain with one on chromosomes 1, 8p, and 10 and/or 16, or disappearance of the allele beyond it which was characterized as a thing and which carried out immortalization.

The cell strain of this invention may be used in the approach of generating the protein of the approach of generating preselected protein, and the epithelial cell origin. For example, the cell strain of this invention is useful in isolation of the malignant prostate gland related protein which may be used as the index of a diagnosis or a target of an immunological therapy. The approach of proteinic generation consists of a phase of collecting one or the protein beyond it produced by the phase and the new cell of culture of an epithelial cell stock of this invention, in one mode of this invention. Identification of the gene which carries out the code of such protein enables construction of the recombination vector for efficient mass production method of the protein or its part.

The cell strain of this invention is useful again also to a trial out of the living body of effectiveness to the prostatic cancer of a reagent for a therapy like for example, the drugs for chemical treatments, a biological response qualification agent, or an antisense oligonucleotide.

The cell strain of this invention is useful also as all cell vaccines for treating or preventing the relapse of a prostatic cancer again. All cell vaccines may be embellished and prescribed for the patient by the foreign gene which is prescribed for the patient with an AJU band in the condition as it is, or carries out the code of various cytokine, a chemokine, adhesion molecules, or the MHC molecule, for example.

The cell strain of this invention is useful on a therapy, in order to prescribe a medicine for the patient to a prostate gland cancer patient again as a stimulus for increasing the immunocyte or the lymph gland cell of the antibody of prostate gland cancer reaction nature, or the peripheral blood origin.

This invention offers the prostate gland cell strain of the non-death used for molecular cloning of the prostate

gland related antigen recognized according to an immune system again. These antigens develop into the recombination vaccine for prevention of a prostatic cancer, or a therapy further.

This invention offers use of the drugs constituent which consists more than of one or it of the cell strain of this invention further, and a non-dead cell stock [be / pharmacology-therapy- / it / diagnostic], and the pharmacology-constituent which consists of a non-dead cell stock.

These of this invention and the other purposes become clear with an attached specification and an attached graph.

Easy explanation of a drawing Drawing 1 A and 1B. The gestalt of the death-ized prostate gland epithelial cell stock, and the property about growth. In order to attain permanent growth of cultured cell 1510-CP generated from the prostatic cancer sample, the immortalization by the retrovirus LXSXN 16E6E7 was required for (1A). or [carrying out transduction of the cell in a passage 3] (1510-CPTX) -- or transduction was not carried out (1510-CPNV) and growth in 24 hole plate was observed at each stage of passages 5 and 10. (1B) is the microphotography (200 times, phase-contrast microscope) of 1510-CPTX after 10 culture passage. This culture image is typical in the prostate gland epithelial cell stock of others which were generated from the benign or malignant sample.

Drawing 2. The manifestation of PSA in the in-house by the benign and malignant prostate gland cell. A paraffin **** organization intercept including the field of the prostatic cancer (arrow head) which permeated with the normal prostate gland epithelium (duplex arrow head) by the prostate gland total extirpation from a patient 1510. Black coloring matter shows association of anti-PSA monoclonal antibody. A manifestation according to a cancer cell to the manifestation of PSA by the normal prostate gland epithelial cell being strongly uniform is weak, and is not uniform. The stroma cell which is in between has not discovered PSA. (200 times).

Drawing 3. The genetic map of chromosome 8p which identified the relative location of the micro satellite index used for the disappearance analysis of heterozygosity.

Drawing 4. PCR analysis of micro satellite D8S136 on the fresh cell obtained from the patient 1542, and the cultivated cell. A lane 1, 1542-NPTX, a passage 26. A lane 2, fresh neoplasm #11 by which minute excision was carried out. A lane 3, 1542 which is not cloned-CP3TX, a passage 21. Neoplasm clone 1542-CP3TX.8.1, 1542-CP3TX.8.3, and 1542-CP3TX.8.4 originating in a lane 4-6 and 8 passage eye of 1542-CP3TX.

Drawing 5 A-5F. IFN-gamma guides the manifestation the MHC class I and II molecule were reinforced by whose front face of 1542-CP3TX. an unsettled 1542-CP3TX cell discovers the class I molecule of the amount of whenever [middle] -- **** (dyeing by monoclonal antibody W6/32) (5A) -- the class II molecule of a detectable amount is not discovered (5(monoclonal antibody L243) B). After being exposed to IFN-gamma 500U/ml for three days, the manifestation of Class I increases (5C), and the manifestation of Class II is guided (5D). It is shown for the comparison of the manifestation of MHC by the EBV-transformation B cell of own house (5E and 5F).

Detailed description This invention offers the potential application to isolation of the Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock originating in many fresh surgical samples containing a normal prostate gland and a prostate gland cancer cell stock and its clone, immortalization, analyses, those researches, and a therapy.

This invention offers the use as the drugs constituents which consist more than of one or it of the cell strain generally stated to the clone of a non-dead cell stock and a cell strain, and here, and those drugs activity reagents.

Especially this invention offers the malignancy which offers the malignant adult prostate gland epithelial cell stock which carried out immortalization, which reaches and suits and which carried out private immortalization, and a normal prostate gland epithelial cell stock. The prostate gland epithelial cell stock which carried out immortalization is set on these specifications. 1510-CP (prostate gland neoplasm), 1512-NP (normal prostate gland), 1512-CP, 1519-CP, 1532-NP (it is described as 1532-NPTX) A certain 1532-NP on February 2, 1996 to American Type Culture Collection (ATCC) of 12301 Parklawn Drive, Rockville, and Maryland as registration number RL-12036 it ****ed. 1532-CP1, 1532CP2 (1532-CP2 currently described as 1532-CP2TX was deposited with ATCC of Rockville and Maryland as registration number CRL-12038 on February 2, 1996.), 1535-NP (1535-NP currently described as 1535-NPTX was deposited with ATCC of Rockville and Maryland as registration watch CRL-12039 on February 2, 1996.) 1535-SV (a spermiducal vesicle, seminal vesicle), 1535-CP1 (1535-CP1 currently described as 1535-CP1TX was deposited with ATCC of Rockville and Maryland as registration number CRL-12041 on February 2, 1996.) 1535-CP2, 1542-NP (1542-NP currently described as 1542-NPTX was deposited with ATCC of Rockville and Maryland as registration number CRL-12040 on February 2, 1996.) 1542-SV, 1542-CP1, 1542-CP2, and 1542-CP3 (it is described as 1542-CP3X) A certain 1542-CP3 was deposited with

ATCC of 12301 Parklawn Drive, Rockville, and Maryland as registration number CRL-12037 on February 2, 1996. This invention also offers the malignant prostate gland epithelial cell stock which was cloned again and which carried out immortalization. Furthermore, this invention also offers the clone characterized as what has disappearance (LOH) of at least one allele heterozygosity again.

The malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock which was cloned in one mode and which carried out immortalization is characterized as a thing with disappearance of the heterozygosity of at least one allele. Disappearance of heterozygosity may take place to one or on beyond it. [of the chromosomes called chromosomes 1, 8, 10, and 16] The malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock of the non-death cloned in one mode is characterized as what has disappearance of heterozygosity in the locus beyond one or it on chromosome 8p.

The malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock of the non-death cloned in the further mode has disappearance of the heterozygosity of the allele beyond one or it in the loci 12-21 on chromosome 8p.

The malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock of the non-death cloned in a certain mode is characterized as a thing with disappearance of the allele of the upper part of D8S133, D8S136, and D8S131. The cloned cell strain which carried out immortalization has the description identified 1542-CP3TX.8.1 which are the malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock of the cloned non-death with which American Type Culture Collection of Rockville and Maryland was supplied on January 15, 1997 based on the convention of Budapest Treaty as ATCC CRL-12265.

The malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock of the non-death cloned in another existing mode is characterized as a thing with disappearance of the allele of the high order of D8S133, D8S136, and D8S131. The cloned cell strain which carried out immortalization has the description identified 1542-CP3TX.8.4 which are the malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock of the cloned non-death with which American Type Culture Collection of Rockville and Maryland was supplied on January 15, 1997 based on the convention of Budapest Treaty as ATCC CRL-12264.

another existing voice — the malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock of the non-death cloned by setting like is characterized as a thing with disappearance of the allele of the high order of the allele of the low order of SFTP-2, D8S136, and C8S131, C8S133, and NEFL. The cloned cell strain has the description identified 1535-CP1TX.14.3 which are the malignant Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell stock of the cloned non-death with which American Type Culture Collection of Rockville and Maryland was supplied on January 15, 1997 based on the convention of Budapest Treaty as ATCC CRL-12263.

Immortalization of the cell lineage and the clone cell of this invention is carried out using a Homo sapiens papilloma virus (HPV) gene or its part. As a certain example, immortalization of the malignant cell is carried out using the part of HPV which carries out the code of E6 **** E7 of a recombination retrovirus. The cultured cell of the malignant prostate gland epithelial cell in which this invention carried out immortalization is still viable over one years or more at stability.

This invention offers isolation of cell lineage with a pure Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell, and the approach of cloning. Especially this approach is effective for removing a non-epithelial cell, especially fibroblast from a cell culture. This approach needs to cut a primary tumor open to a precision to a cell or an organization similar to a prostate gland and a malignant prostate gland normal in gestalt. In order to check growth of fibroblast, it is cultivated by the culture medium which hardly contains fetal calf serum and/or cholera toxin, or does not contain them at all. It is used in order to remove fibroblast from a prostate gland epithelial cell while also cultivating judgment trypsinization. Consequently, the epithelial cell system is preferably pure 100% 90% or more. A cell turns into an epithelial cell pure 100% as a result of cloning of cell lineage performed succeedingly.

Another field of this invention is the approach of the selection of a malignant prostate gland epithelial cell which carried out immortalization.

In the former technical field concerned, markers, such as growth of the malignant tumor in the positive regulation (up-regulation) of the PSA system by a PSA manifestation, a PAP manifestation, and the androgen and a nude mouse and a karyotype of heteroploid, have been used as an approach of distinguishing a malignant prostate gland epithelial cell from a normal prostate gland epithelial cell. However, in these markers, a malignant prostate gland epithelial cell is certainly undistinguishable from a normal cell. The approach of the selection of a malignant prostate gland epithelial cell in which this invention carried out immortalization which makes loss of heterozygote an index is constant, and the approach of reproducible selection is offered. This approach uses at least one DNA marker which identifies the specific deletion of the allele seat on a specific chromosome. As a mode of this

approach, a DNA marker identifies the specific deletion of the allele seat on a No. 8 chromosome. Many DNA markers will be used for this approach in order to identify the deletion of one or more allele seats on a specific chromosome, or the allele seat deletion on two or more chromosomes.

In the approach of detecting and identifying a malignant cell, it is kept warm with DNA isolated from the prostate gland epithelial cell system which carried out immortalization of the unique PCR primer to the locus on a specific chromosome, and PCR assay is performed. By the comparison with the DNA control obtained from the known normal cell, LOH is analyzed for a magnification product about one or more locus grade. The criteria of LOH are the comparison with normal DNA control, and are that at least 75% of allele seat deletion is detected with a radiograph by the malignant cell. The criteria of LOH are that at least 30% of allele seat deletion is detected by the malignant cell including densitometer analysis for other approaches learned by what has the usual knowledge in the technical field concerned to detect a difference.

In a normal prostate gland cell, or the cell lineage and the clone of a malignant prostate gland epithelium in which this invention carried out immortalization are not found out, they are useful also to specific to the malignant prostate gland epithelial cell which is not activity, or the identification of a new gene which is carrying out the superfluous manifestation. Although a cancer induction gene, a growth factor gene, an oncogene, and an antioncogene are included in this new gene, it does not restrict to this.

These genes are identified using the approach of RNA total analyses, such as standard total hybridization known by what has the usual knowledge in the technical field concerned, a difference notation, or sample difference analysis (RDA) (51-52). Cloning of the new gene is carried out using the technique of the standard molecular biology known by what has the usual knowledge in the technical field concerned. The identification of a new gene which participates in development of a prostatic cancer will enable development (42) of the anti-code chain oligonucleotide which is useful to inhibition or control of a prostatic cancer, or development of a recombinant DNA vaccine.

The cell lineage of this invention serves as a model of epithelial cell oncogene study. For example, especially the prostate gland epithelial cell system of this invention is useful when you understand tumorigenic transformation of a prostatic cancer. This invention offers the benign prostate gland cell lineage for investigation of the role of the inherited character of a prostatic cancer in order to use for combination with the malignant prostate gland cell lineage of the patient origin same as an indicator which specifies a genetic occurrence in case the phenotype of a cell changes from a good nature to malignancy.

The cell lineage of this invention can be used for the approach of production of pre-selection protein, or some of the processes and malignant prostate gland epithelial cell origin protein. For example, the cell lineage of this invention is useful to isolation of the prostatic cancer related protein which works as the marker for a diagnosis or a target of an immunity therapy. In concreteness of invention, a proteinic process is prescribed to include the process of recovery of the protein beyond one produced by the process of culture of the epithelial cell system of this invention, and the new cell, or it. Identification of the gene which carries out the code of such protein enables construction of the host cell for efficient mass production of a recombination vector and protein, or its part using standard science technique.

This invention contains the new recombination virus which discovers prostatic cancer related protein or its part. A recombination virus will discover the similar molecule which reinforces the immune response to one or the costimulatory molecule beyond it, cytokine, an MHC molecule, a chemokine and prostatic cancer related protein, or its part. The construction and the manifestation of an exogenous gene product by the recombination virus vector are performed by the approach learned by what has the usual knowledge in the technical field concerned (43-50).

This invention contains DNA or RNA of the Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell system or the clone origin which carried out immortalization. DNA or RNA isolated from the Homo sapiens malignant adult prostate gland epithelial cell which carried out immortalization of the interesting thing shows LOH. Moreover, the immortalization Homo sapiens normal cell which carried out harmonious autotransplantation, and DNA and RNA of the malignant adult prostate gland epithelial cell origin are interesting. DNA and RNA which were isolated, or those oligonucleotides will be used for detection and a diagnosis of the precancer of a prostatic cancer or an individual. DNA and Vessel A, or an oligonucleotide is used as the probe inquiry and/or the primer which are used by the technique of standard molecular biology, such as analysis used for detection and a diagnosis of southern blot analysis, NOZAN blotting analysis, PCR, RT-PCR and a prostatic cancer, or precancer. Interesting things are DNA which has the deletion of the allele seat on one, such as 1, 8, 10, and a No. 16 chromosome, or the chromosome beyond it, and corresponding RNA. Especially interesting things are DNA which has the deletion of the allele seat

beyond one or it on a No. 8 chromosome, and corresponding RNA.

Unreserved DNA which carries out the code of a prostatic cancer antigen or its antigen radical (epitope) will be used for the active immunity therapy to a prostatic cancer. In order to guide the immunoreaction of the cellularity and humoral both to the prostatic cancer antigen by which a code is carried out, or its antigen radical using the technique known in the technical field concerned, it can inject with unreserved DNA combined with unreserved DNA or an unreserved lipid to muscles or the skin (33-41).

The cell lineage of this invention is useful also to assay of the effectiveness of a remedy over the prostatic cancer within [in-the-living-body or] a test tube. For example, this effectiveness can be screened about hereditary reagents, such as chemical treatment medicine, a vital reaction modifier, or an antisense oligonucleotide. The chemistry sample or drugs which should be authorized is put under cell existence within [in-the-living-body or] a test tube. The effectiveness of the chemistry sample or drugs to a cell is authorized after exposure of a suitable period by the approach learned in the technical fields concerned, such as inhibition of cytotoxin assay, protein inhibition assay, and tumor growth. The chemistry sample or drugs which checks metabolism required for life support, or kills a cell is considered to be an effective remedy.

The cell lineage and the clone of this invention serve also as all cell vaccines for preventing the therapy or recurrence of a prostatic cancer. All cell vaccines remain as they are, and it is combination with adjuvants, or a metaphor is prescribed for the patient in the form embellished with the external cause gene (transgene) which carries out the code of various cytokine, a chemokine, a costimulatory molecule, adhesion molecules, the MHC molecule, etc. Such qualification is used in order to heighten the immunogen of this invention, and the immunity curative effect of a vaccine.

a gene -- electroporation, polybrene induction DNA installation, a plasmid, a recombination virus, etc. -- minding -- etc. -- it is included in the Homo sapiens malignant prostate gland epithelial cell system or clone which carried out immortalization by the approach learned in the technical field concerned. The recombination virus containing the gene of the purpose beyond one or it is built so that it may be indicated by WO 94/16716, WO 96/11279, and WO 96/10419.

Although the costimulatory molecule which can be used in this invention contains B7-1, B7-2, B7-3, ICAM-1, LFA-1, LFA-3, CD72, etc., it is not restricted to these.

Although the cytokine which can be used in this invention contains IL-2, GM-CSF, TNFalpha, IFNgamma, IL-12, IL-4, IL7, etc., it is not restricted to these.

Although an MHC molecule contains Class I, a class II molecule, etc., it is not restricted to this. MHC similar molecules, such as a non-standard MHC molecule or CD1, will also be used.

Although a chemokine contains RANTES, IL-8, MIP1-alpha, MIP-beta, etc., it is not restricted to these.

The cell lineage of this invention is useful on the therapy for treatment of a prostatic cancer patient as a stimulant of the immunocyte of the cell origin of the stimulant which produces a prostatic cancer reactivity antibody, peripheral blood, or lymph gland.

This invention offers the prostate gland cell lineage which carried out immortalization for the use to molecular cloning of the prostatic cancer related antigen recognized by the immune system. The antigen by which cloning was carried out is developed to the recombination vaccine for control of a prostatic cancer, or a therapy.

Furthermore, this invention offers use [diagnostic / pharmacology-therapy-] of the drugs compound which consists of immortalization cell lineage of this invention, and the drugs constituent which becomes a list from immortalization cell lineage and immortalization cell lineage.

A drugs constituent, a vaccine, and immunogen are prepared according to the standard technique known by what has the usual technique in the pharmacology field. Dosage required for a patient can be prescribed to a patient by such constituent by the medication approach for which it is the technique known by what has the usual technique in the technical field concerned, and was suitable, taking factor ****, such as age for every patient, weight, and condition, into consideration.

The approach of immunization by the constituent, the vaccine, and immunogen is the parenteral approach (an intravenous injection, injection under the peritoneum, intradermal injection, an intramuscular injection, or subcutaneous injection). ***** may be directly medicated with a constituent, a vaccine, and immunogen.

furthermore, a constituent -- the inside of a test tube -- setting -- an antigen -- it can use in order to stimulate a unique cytotoxic T lymphocyte, and this lymphocyte can also be returned to a patient that back.

a constituent, a vaccine, and immunogen -- adjuvants, such as an alum, imperfect Freund adjuvants and its prototype, cytokine, a costimulatory molecule, a chemokine, adhesion molecules, and a HMC molecule, --

coadministration -- or repetitive administration will be carried out. furthermore, a constituent, a vaccine, and immunogen decrease the side effect of an antineoplastic drug, an antitumor drug, and a anticancer drug as an antineoplastic drug, an antitumor drug, and a anticancer drug -- it is -- it is -- the drugs made to ease -- coadministration -- or repetitive administration will be carried out.

The example of the constituent of a vaccine or this invention includes liquid pharmaceutical preparation, such as preparation for subcutaneous injection, intradermal injection, muscle injection, or an intravenous injection, as suspension, syrups, elixir medicine, and parenteral. A drugs constituent will be mixed with stable support, such as sterilized water, a physiological saline, and a glucose, a diluent, or a ** form agent.

The effectiveness of treatment can be authorized by production of the antibody or immunocyte which recognizes peptides or those part of malignant cell or prostatic cancer, evaluation of antigen idioblast toxicity, production of specific cytokine, or retreat of a neoplasm.

The Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell which carried out immortalization, or its part will be supplied in the form of a kit. Probably, the kit contains one, the immortalization Homo sapiens adult prostate gland epithelial cell beyond it, or its part. With the part, the dissolved cell and the dissolved cell fragment, an intercellular substance, an extracellular component, protein, DNA and RNA, a glycolipid, etc. are included. A kit may also contain the Homo sapiens adult malignant immortalization prostate gland epithelial cell of the self-origin, or its part in the Homo sapiens adult normal immortalization prostate gland epithelial cell of the self-origin, or a part of [the] combination. A kit consists of combination of the Homo sapiens adult normal cell lineage which carried out immortalization, 1532-NP and a self-origin immortalization Homo sapiens adult malignant cell system, 1532-CP1, and/or 1532-CP2 in a certain mode. another voice -- it sets like and a kit consists of combination of Homo sapiens adult normal epithelial cell system [which carried out immortalization], 1535-NP and self-origin immortalization Homo sapiens adult malignant cell system, 1535-CP1, 1535-CP2, and/or 1535-CP1TX.14.3.

Moreover, in another mode, a kit consists of one or combination beyond it among Homo sapiens adult normal epithelial cell system [which carried out immortalization], 1542-NP and self-origin immortalization Homo sapiens adult malignant cell system, 1542-CP1, 1542-CP2, 1542-CP3, and 1542-CP3TX.8.1., and/or 1542-CP3TX.8.4. A kit may also contain the container according to individual containing suitable support, a diluent, and a ** form agent. A kit may also contain adjuvants, cytokine, a costimulatory molecule, a chemokine, adhesion molecules, an MHC molecule, an anti-neoplasm agent, an antitumor agent, an immunoassay reagent, an PCR reagent, a radiation indicator, etc. Additionally, probably, a kit contains the textbook of mixing of an ingredient or association, and/or administration.

the vocabulary used here of "having carried out immortalization" means increasing continuously, without aging, when [at which cell lineage does not have a glass instrument] it was alike, it sets and it cultivates by the optimal growth medium.

This invention contains the polyclonal and monoclonal antibody to cell lineage of this invention. These antibodies can be used for preparation of the antibody content constituent used by the approach of this invention. An antibody is prepared according to the approach learned by what has the usual technique in the technical field concerned. Especially the monoclonal antibody produced to the prostate gland cell lineage in which this invention carried out immortalization is useful to the use to detection and the therapy of a prostatic cancer. An antibody or its antigen binding site is combined with a malignant prostate gland cell. An antibody or its antigen binding site has immunoreactivity to at least one prostate gland tumor rejection antigen or at least one prostatic cancer related antigen, and its antigen radical.

An instantiation-antibody molecule is the part of the immunoglobulin molecule which has an antigen binding site containing a perfect immunoglobulin molecule, a substantial perfect immunoglobulin or F (ab), and F (ab)₂ and F (v). A polyclonal or a monoclonal antibody is prepared according to the approach learned by what has the usual technique in the technical field concerned (13 research techniques in Kohler and Milstein, a 1975 Nature 256:495-497;Campbell monoclonal antibody technique, a GESSHI animal, manufacture of a human hybridoma, the description Burdon et al (eds) (1985), biochemistry, and molecular biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam). an antibody or its part -- Traunecker et al The EMBO J.10(2):3655- 3659, 1991 and Milenic, and J.E.et al Cancer Research 51 and 6363- it will be manufactured by the genetic engineering-technique including a chimeric antibody and a single strand antibody technique so that 6371, 191, and a Homo sapiens mold antibody may be indicated by United States patent 5,530,101st.

An antibody or its part will be used for an immunity therapy. An antibody or its part will be prescribed for the patient with the chemical treatment agent or immunosuppresant which is independent or is known in the technical

field concerned.

An antibody or especially its part will be used also as immunotoxin for acting as the target of the malignant prostate gland cell, and killing and wounding it. Immunotoxin is useful, especially although it characterizes with two components and a cell is alternatively killed and wounded in the inside of a test tube, or in the living body. One constituent is a cytotoxic agent which usually acts on a cell death-dealing, when a cell is contacted or absorbed. The 2nd constituent is known as a transportation medium and offers a means to convey a toxic agent to specific cell types, such as a malignant prostate gland cell. Two constituents are mutually combined by various chemical phases known well. For example, connection to an antibody will be performed by a hetero bifunctional cross linking agent, for example, SPDP, a carbodiimide, glutaraldehyde, its analog, etc. when a cytotoxic agent is protein. the ammunition of "monoclonal antibody-toxin fusant:magic which may set the procedure of various production of immunotoxin to the technical field concerned, and is known — aiming — " — it sees Thorpe et al, the mono-
KURONARU antibody in clinical medicine, Academic Press, and in pp.168-190 (1982). The constituent is outlined by Chaudhary et al Nature 339,394 (1989), and can also be made and connected.

Various cytotoxins are suitable for the use in immunotoxin. Cytotoxin drugs Radionuclides, such as iodine-131 or other iodine isotopes, yttrium 90, a rhenium -188, a bismuth -212, or other alpha-rays emitters, Much chemical treatment medicine, such as vindesine, methotrexate, an ADORIA sewing machine, taxol, and cis- PURACHINAMU, Climax burdock antiviral protein, the Pseudomonas exotoxin A, a lysine, diphtheria poison, lysine A chains, and these prototypes (Chimeric oxins, Olsnes and Phill, and ribosome inhibitor protein like Phannac.Ther.25,355-381 (1982) —) Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, eds.Baldwin and Byers, pp.159-179,224-266, Academic Press, and 1985 [and] Although cytotoxin protein, such as reference, is included, it does not restrict to these.

s either an indicator or a non-indicator used to the purpose of a diagnosis, as for an antibody?

A non-labelled antibody will be used in combination with other antibodies by which the indicator was carried out. Many kinds, such as a radionuclide, fluorescence, an enzyme, an enzyme substrate, an enzyme cofactor, enzyme inhibitor, a reagent, and such a thing, of indicators are used. The immunoassay of many molds is useful and it is known by what has the usual technique in the technical field concerned.

The cell lineage in this invention, a gene, protein, and an antibody are useful to various therapies and diagnoses. More specific illustration is indicated below.

The specified bibliography is applied to this specification by reference.

A patient's property in which the example 1(1) culture epithelial cell sequence was generated The prostate gland epithelial cell sequence was generated from the sample of the radical cure-prostatectomy originating in six patients who are consistent at a point with the neoplasm of inside thru/or an advanced phase (Gleason phase 6-7). (Refer to Table 1.) Culture of a cell was generated by mechanical destruction or the digestion like an enzyme of the primary tumor tubercle excised from the fresh radical cure-prostatectomy sample. Refer to the example 2 for detailed description of the culture approach.

Table 1: Prostate gland cancer patient : clinical information

患者番号	年齢(歳)	手術前PSA(ng/ml)	手術後Gleason 段階
510	51	14.9	3+3=6
512	64	14.0	4+3=7
519	54	7.7	4+4=8
532	52	5.0	3+3=6
535	66	2.2	3+5=8
542	48	14.3	3+5=8

2) Pathological analysis of the preparation In the pathological analysis of the fresh preparation used for generation of a prostate gland cancer cell sequence, a certain cancer sample is a pure neoplasm, and it became clear that another thing consists of the mixture of a good nature and a malignant cell. Preliminary identification of a sample was left to the trial by the naked eye by the pathologist who has a technique. Refer to Table 2. The identification under a microscope was left to the trial of ten high expansion visual fields by the pathologist who has a technique.

A BPH= benign prostatic hypertrophy, the neoplasm between PIN= prostate gland epithelial cells. The mixture of a= cell type and b= 80% of sample consist of benign muscle fiber stromata. The focus of c= 1 microscope study-cancer was accepted.

Table 2: Pathological analysis of fresh prostate gland sample

患者番号	肉眼による標本	顕微鏡学的解析 (推定% 総細胞数)			
		良性	BPH	PIN	腫瘍
1510	腫瘍	40 ^a	0	40 ^a	60
1512	正常前立腺	100	0	0	0
	腫瘍	90 ^a	90 ^a	0	10
1519	正常前立腺	100	0	0	0
	腫瘍	50	0	0	50
1532	正常前立腺	95	0	5	0
	腫瘍1	100	0	0	0
	腫瘍2	0	0	0	100
1535	正常前立腺	20 ^b	0	0	0
	精囊	100	0	0	0
	腫瘍1	0	0	0	100
	腫瘍2	5	0	10	85
1542	正常前立腺	0	95	5	-
	精囊	100	0	0	0
	腫瘍1	0	0	40	60
	腫瘍2	0	0	40	60
	腫瘍3	0	0	40	60

3) Check of the epithelium origin of a prostate gland origin cell lineage train The epithelium origin of a prostate gland origin cell lineage train was checked by cytokeratin dyeing. Both the amount of giant molecules and low-molecular-weight cytokeratin were discovered in all the cell lineage trains of 16 originating in six radical cure-prostatectomy samples (a normal prostate gland, a prostatic cancer, normal seminal vesicle). Neither of the cell lineage trains of the prostate gland origins discovered PSA (however, the early passage of 1519-CP removes), or PAP. Reference of Table 3: Although the manifestation of b=PSA and PAP containing both F= fibroblast, a NP= normal prostate gland, SV= seminal vesicle, CP= carcinoma prostate gland, the amount of a= giant molecules, and low-molecular-weight cytokeratin was recorded in the culture passage number 5, it disappeared, after continuing the passage within a test tube (in vitro). c = observed dyeing may have been the background.

Table 3: Immunocytochemistry-analysis of prostate gland epithelial cell sequence of non-death

患者#	細胞原	% 陽性細胞 (染色強度)		
		PSA	PAP	サイトケラチン*
1510	F	0	0	25(1-2+) ^c
	CP	0	0	>75(4+)
1512	NP	0	0	>75(4+)
	CP	0	0	>75(4+)
1519	F	0	0	>75(1+) ^c
	CP	>75(2-3+) ^b	>75(4+) ^b	>75(4+)
1532	F	0	0	5(1-2+)
	NP	0	0	>75(4+)
	CP ₁	0	0	>75(4+)
	CP ₂	0	0	>75(4+)
1535	NP	0	0	>75(4+)
	SV	0	0	>75(4+)
	CP ₁	0	0	>75(4+)
	CP ₂	0	0	>75(4+)
1542	NP	0	0	>75(4+)
	SV	0	0	>75(4+)
	CP ₁	0	0	>75(4+)
	CP ₂	0	0	>75(4+)
	CP ₃	0	0	>75(4+)
NCaP		>75(4+)	25(3-4+)	>75(4+)

4) Check of the phenotype of cell surface The check of the phenotype of cell surface was indicated to the example II table 6.

5) Genetic analysis of a prostate gland epithelial cell sequence The deletion of the allele in the 8th chromosome is connected with PIN and an erosive prostatic cancer, therefore has suggested the alternative way for the property decision of the epithelial cell sequence of the prostatic cancer sample origin. Nine deletion (LOH) of heterozygosity [in / on one line of the cell lineage train of the cancer origin which is not cloned and / one locus] which examined became clear by the deletion trial of the allele in ten separated loci on chromosome 8p using PCR (polymerase chain reaction), and it has suggested that it is the long-term primary prostate gland tumor cell sequence by which this was established. Although careful attention was paid to separating the purest neoplasm fragment for culture within a test tube (in vitro) When was succeeding and the original neoplasm sample was evaluated by the microscope It was the variable mixture which consists of a benign epithelium, BPH and PIN, and/or an erosive neoplasm (see Table 2), and since there was a possibility that LOH might be hidden, in order to be exact property decision, cloning of an epithelial cell was needed. The final genetic property decision of the prostate gland cell lineage train indicated by this specification and cloning of the single cell of the above-mentioned sequence were indicated below.

Cloning and property decision of the single cell of an example 2 non-death malignant prostate gland epithelial cell

Generation of an ingredient and an approach primary cell culture The preparation used for production of a cell lineage train was got from whenever [inside] in NCI by six continuous patients who are performing a radical cure-prostatectomy for the therapy of an advanced local prostatic cancer (from the Gleason phase 6-8 and neoplasm phase T2C to T3C). The fresh excision prostate gland directly obtained from the operating room was separated by the skillful pathologist under the sterile condition. The organization called a normal prostate gland, a prostatic cancer, or a normal seminal vesicle in inspection by the naked eye was separately separated in order to produce a cell culture. Culture was generated by mechanical destruction (diameter <1cm fragment) or the digestion (>1cm fragment) (21) like an enzyme. The sample acquired from the patient of No. 1510 and No. 1512 was prepared by digestion like an enzyme, and subsequent culture was generated by mechanical destruction. The organization subdivided for enzyme-digestion suspended in the 100ml digestive culture medium, and left it at the room temperature on the churning plate overnight. PBS which had the suspension of the single cell produced as a result sterilized washed, and it re-suspended in the growth medium (see the following), and distributed to 6 hole plate covered by the rat tail I-beam collagen (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA). For mechanical destruction of a sample, the organization fragment was carefully subdivided on the cube of a 2-3mm four way type in the little growth medium, and the suspension of the organization and cell which were produced as a result was distributed to 6 hole plate. All culture was generated by volume of 1ml per hole, and was kept warm by CO₂ 37 degrees and 5%. In order to fix the cell and organization under growth and to make a plate paste, they were put for two to three days. Next, the non-pasted up residual fragment was sucked up carefully and the hole was filled with the fresh culture medium of three to 5 ml. Exchanging the culture culture medium day by day [2-4] regularly, the increased adhesion cell performed desorption processing by the trypsin next. The established growth culture was maintained in the tissue culture flask (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ). The growth medium for a prostate gland and a seminal vesicle epithelial cell sequence is a keratinocyte blood serum deficiency medium (keratinocyte - [SFM]) containing 25microg [/ml] cow hypophysis extract, 5 ng/ml epidermal growth factor, 2mM L-glutamine, 10mM HEPES buffer solution, an antibiotic, and 5% heat inactivation foetal calf serum (FBS) (Biofluids, Rockville, MD). It consists of GIBCO-BRL, Grand Island, and NY. For generation of the epithelium culture from the fresh preparation, in order to decrease to 1-2% and/or to protect the concentration of FBS from growth of contamination-fibroblast, the cholera toxin (Sigma, St.Louis, MO) was added by ten to 20 ng/ml concentration. When fibroblast remains in epithelial cell culture medium rarely, in order to gain a pure epithelial cell culture, judgment-trypsinization (in order to leave the epithelial cell which kept it warm at 37 degrees C for 1 to 2 minutes, next grew further, washing removal of the fibroblast of isolation is carried out) was very successful. The fibroblast sequence of the self-origin was produced from mechanical destruction of benign interstitial tissue of prostate, and was cultivated by RPMI 1640 culture medium which contains heat inactivation FBS 10%. The Epstein-Barr-virus infection B cell sequence of the self-origin was produced using the standard technique, and was cultivated in FBS 1640+10% of RPMI(s).

culture of a metastatic prostate gland cancer cell The epiphytal cell lineage trains DU [LNCaP and] 145, PC-3 (ATCC, each of CRL1740, HTB81, and CRL1435), and TSU-Pr1 (a Johns Hopkins university, Baltimore,;Iizumi et al. [that was also generously offered by Dr. William Issacs of MD], and J.Urol.137:1304- indicated by 1306 and 1987) were maintained in RPMI 1640 culture medium which added FBS 10%.

Immortalization of a primary cell culture The immortalization of a cell culture was attained by carrying out transduction by the retrovirus (also generously provided from Dr. Denise Galloway, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, and WA) (22) called LXS_N 16E6E7 which carries out the code of the neomycin phosphotransferase which is 16 (HPV16) human papillomavirus human serum protein typeE6, E7 transformation protein, and an eukaryote selective marker about the cell increased in activity.

In preparation of immortalization, divided short-term epithelial cell culture (culture passage 1-3) into 1:2, it was made to re-paste up in 6 hole plate for at least 48 hours, and culture of 50-60% of confluent state was obtained. The transduction by the LXS_N16E6E7 recombination virus was attained by transposing a culture culture medium to the culture supernatant collected from the retrovirus production sequence PA 317 between 24 hours (22) under existence of a 10microg/ml DEAE-dextran (Sigma).

Cloning of the single cell of the cell culture by which immortalization was carried out The clone ensemble of non-death epithelial cell culture was produced for research of a LOH property. When stated briefly, recovery of the confluent cell culture was carried out by the trypsin, and washing and counting were performed. The cell was continuously diluted to 2-5 cell / concentration of ml in the keratinocyte growth medium (see the top), and was

distributed to eight to ten holes of 96 holes and a flat bottom microculture plate 200microl / hole (≤ 1 cell hole) every. In order to secure sufficient cell for a DNA extract and cold storage, the confluent cell which has the origin in dilution of < 1 cell / hole was developed on 24 hole plate.

Immunocytochemistry-analysis For the immunocytochemistry-research of a cultured cell by which immortalization was carried out, recovery of the cell was carried out, it was washed by the trypsin, and it was made the pellet. Next, it fixed with buffer-ized formalin 10%, and the pellet of a cell was surrounded from paraffin. It fixed with formalin and the fresh organization fragment of the prostate gland sample origin was also surrounded from paraffin. It put after the slide which prepared the 5-micron intercept and was charged from the fresh neoplasm sample and the cell lump which cultivated ((Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 23). An avidin-biotin peroxidase complex method And the following primary antibodies It uses. Immunocytochemistry performed : — an anti-Homo sapiens prostate gland specific antigen (PSA) Monoclonal antibody () [Dako] Corp, Carpenteria, a CA; anti-Homo sapiens prostate gland acid phosphatase (PAP) polyclonal antibody (Dako Corp, Carpentania, CA); anti-Homo sapiens cytokeratin CAM 5.2 () [Becton-Dickinson,] [San] Jose, CA,; and anti-Homo sapiens cytokeratin AE1/AE3 (Boelinger-Mannheim, Indianapolis, IN). The cell lineage train and the neoplasm tissue fragment were evaluated based on the rate ($< 25\%$, $25-50\%$, $50-75\%$, or $> 75\%$) and dyeing reinforcement of dyeing of a cell (from 1+ to 4+).

Flow cytometry It was that the thing [in / over a long period of time / a prostate gland epithelial cell sequence] for which the amount of manifestations of an important surface molecule is opted immunologically is interesting for prospective research and the further property decision. :CD54 (anti-ICAM- 1) which carried out recovery of the cell culture by which immortalization was carried out, and performed dyeing by the following monoclonal antibodies, CD80 (anti- — 7.1) and CD86 (anti- — 7.2) (Becton-Dickinson), W6/32 (anti-HLA-A, B, C), and L243 (anti-HLA-DR) (ATCC, Rockville, MD) (21). In order to reinforce a manifestation in the front face of an MHC molecule, the cell was cultivated under IFN-gamma 500U/ml existence before flow-cytometry analysis for 72 hours.

Microdissection ** DNA extract** The microdissection of the focus which the normal prostate gland epithelial cell or normal erosive tumor cell of the organization sample origin which fixed with formalin and was surrounded from paraffin chose was performed under direct solar radiation microscope visualization as it was already indicated (24, 25, 26). When stated briefly, non-dyed formalin fixation and the 5-micron histological organization fragment which carried out paraffin envelopment were prepared on the slide glass, and it deparaffinization-ized twice by the xylene, washed twice by ethanol 95%, and dyed and was air-dry by eosine. The adjoining fragment was dyed by the hematoxylin and eosine. It chose from the slide glass which carried out eosine dyeing of the interested specific cell, and microdissection was carried out with the needle of 30 gages of throwing away which added amelioration. DNA was extracted from 1-5X10³ cells obtained by microdissection. The cell originating in one or more adjoining capillaries which cancer or a normal epithelium separated depending on the case was combined. DNA was extracted also from 1-5X10⁴ cells obtained from the culture which is increased in [again] activity, and by which immortalization was carried out. The cell was immediately re-suspended in 0.01 M TRIS-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 1%Tween 20, and the solution (to the cell which carried out microdissection, it is 200microl to 20microl or a cultured cell) containing 0.1mg [/ml] proteinase K, and incubated at 37 degrees C overnight. Following the incubation, in order to carry out inactivation of the proteinase K, the mixture was boiled for 5 to 10 minutes, and it saved at 4 degrees C for the next polymerase chain reaction (PCR) analysis.

Detection of the deletion of heterozygosity SFTP-2; D8S133, D8S136, NEFL, D8S137, D8S131, D8S339, and ANK were included in the multi-DNA marker used for the detection of LOH in a chromosome eight p12-21. :1SFTP2 nucleic-acid array: whose group of the PCR primer used in order to amplify a DNA micro satellite marker is as follows — 6861 primers: — primer name Primer array SFTP2CA CAGCCCAGACAGGCTGGAA (Seq.ID No.1) SFTP2GT ACTTTTCTGGCCAACTCCTG(Seq.ID No.2)

magnification array minimum length: — 0.111 magnification array maximum length: — 0.157Wood and S Genomics 24:597- it is indicated by 600 and 1994. SFTP2 is located in the field between eight p11-8p22.
2D8S 133 nucleic-acid array: — M73471 primer: — primer name Primer array D8S133CA CAGGTGGGAAACTGAGGGA (Seq.ID No.3)

D8S133GT AGCAACTGTCAACATATTGCTC(Seq.ID No.4)

magnification array minimum length: — 0.094 magnification array maximum length: — it is indicated by 0.112Wood, S Cytogenet Cell Genet 58:1932, 1991:Wood, S Genomics 13:232, and 1992.

3) D8S136 primer : primer name Primer array D8S136CA GCCCAAAGAGGAGAATAAA (Seq.ID No.5)

D8S136GT CTGTTTCCACACCGAAGC(Seq.ID No.6)

magnification array minimum length: — 0.071 magnification array maximum length: — 0.089Wood and S Cytogenet

CellGenet 58: — it is indicated by 1932 and 1991.

4) NEFL nucleic-acid array: — L04147 primer: — primer name Primer array 214 GCAGTAGTGCCGCAGTTTCA (Seq.ID No.7)

215 TGCAATTCATCTTCCTTTCT(Seq.ID No.8)

magnification array minimum length: — 0.137 magnification array maximum length: — 0.147Rogaev and E.Hum.Mol.Genet. — it is indicated by 1:781 and 1992.

5) D8S 137 nucleic-acid array: — X61694 primer: — primer name Primer array D8S137CA AAATACCGAGACTCACACTATA (Seq.ID No.9)

D8S137GT GCTAATCAGGGAATCACCCAA(Seq.ID No.10)

magnification array minimum length: — 0.152 magnification array maximum length: — 0.161Wood, S Cytogenet CellGenet 58:1932, 1991;Wood, and S Nucleic AcidRes.19: — it is indicated by 6664 and 1991.

6) D8S131 primer : primer name Primer array 131CA 2-1 ACATAGGCTGGAGAGTCACAGG (Seq.ID No.11)

131CA2-2 GGATGAGGCTCAGCACACAAGC(Seq.ID No.12)

magnification array minimum length: — 0.132 magnification array maximum length: — :Yu and CE Hum.Mol.Genet. which are indicated by 0.144 citations — 3:211 and 1994.

7) D8S339 primer : primer name Primer array WT251-A TAGATGTTACCATTTCAC (Seq.ID No.13)

WT251-B GATTAGATCTTGGATCAG(Seq.ID No.14)

magnification array minimum length: — 0.162 magnification array maximum length: — :Thomas and W.Hum.Mol.Genet. which are indicated by 0.176 citations — 2:828 and 1993.

3) Ank nucleic-acid array: — D16990 primer: — primer name Primer array ANK1.PCR1.1

TCCCAGATCGCTCTACATGA (Seq.ID No.15)

ANK1.PCR1.2 CACAGCTTCAGAAGTCACAG(Seq.ID No.16)

it is indicated by Polymeropoulos et al.Nucleic Acid Res 19:969 and 1991.

PCR was performed as already indicated (19). If it states briefly, 12.5microl PCR reaction mixture 200microM dATP, dGTP, and a dTTP;40microM dCTP;0.8mM primer (in Research Genetics, Huntsville, Ala., or an Applied Biosystems DNA synthesis machine) The Taq polymerase (Boelinger Mannheim) of the compounded;2microcurie [α 32P] dCTP;16microM tetramethylammonium chloride (27);1X PCR reaction buffer solution (1.25mM MgCl₂ is included) and one unit was included. In order to improve magnification and precision of a generation product in marker D8S133 and D8S137, DMSO was added 5%. The reaction was continued with the incubation for 2 minutes about all markers at annealing of 28 to 40 cycles (it is dependent on a marker), an expanding reaction (it is 30-second and 72-degree-C 30 seconds at 30 seconds and 95-degree-C annealing temperature), and 72 degrees C :o :95-degree-C 2 minutes performed as follows, and a degree. The annealing temperature over each marker was experientially determined from the first guess based on the die length of a primer, and a presentation. t denaturalized at 90 degrees C for 5 to 10 minutes, and the magnification DNA sample by which the indicator was carried out was put on the gel which consists of acrylamide (30:0.8 acrylamide: screw acrylamide), 5.6M urea, a 32% formamide, and 1X TBE (0.089M Tris pH8.3, 0.089M boric acid, 0.002M EDTA) 7% (28). Electrophoresis of the sample was carried out by 95 for 2 to 4 hours. Gel was imprinted in the gel filter paper (Bio-Rad) for sequencing, and performed the radiograph with the Kodak X-OMAT film. The criteria of LOH were determined as at least 75% of deletion in one allyl compound by the direct visualization by three independent inspectors as compared with fresh PBL contrast of the self-origin. When sufficient quantity of DNA was usable, LOH was proved by at least two kinds of independent experiments.

Organization acquisition for a result cell culture Since it was known that difficulty will follow on production of the non-death prostate gland tumor cell sequence of the primary (non-metastatic) sample origin conventionally, the crude, first biggest cancer tubercule (1 to 3cm) of appearance was chosen as fresh organization Hara for producing a cultured cell. next, microscope observation of the organization fractionation which the first 3 test patients 1510, 1512, and 1519) origin adjoins — since — it became clear that mixture with various good nature prostate gland epithelia, benign prostatic hypertrophies (BPH), tumorigenesis (PIN) in a prostate gland epithelium, and infiltrative cancer cells was contained in "cancer" sample. However, "normal" sample of a patient 1512 and the 1519 origins consisted of only benign prostate gland epithelia (Table 2).

In order to raise possibility of obtaining the pure cancer cell for generating a cancer cell sequence from a next patient, the small organization fragment (<1cm) was gained with tissue culture, freezing, and the contiguity intercept for paraffin sections. Furthermore, when possible, it was chosen from each sample for cultured cell production of two or more separate cancer organization fragments. By using these conditions [****], they are

three fundamental prostate gland removal operation samples (patients 1532, 1535, and 1542).

It was possible to have gained the organization intercept which is alike, sticks and contains at least 95% of tumorigenesis cell (PIN and invasion neoplasm) by six trials among 7 times. Furthermore, the organization fragment suitable for generation of three good nature prostate gland epithelial cell sequences and two good nature seminal vesicle epithelial cell sequences succeeded in carrying out dissection extraction from these fundamental prostate gland removal operation samples (Table 2).

The immortalization of a prostate gland origin cell lineage train, and immunocytochemistry-analysis Except for one of 17 preparation (patient 1519 origin normal prostate gland) shown in Table 2, all were easily established by short culture. However, cell proliferation was comparatively late, and in order to establish the cultured cell with the viability force for five to six weeks or more which grows actively, the immortalization of the epithelium cultured cell within a test tube was required for it. The transformation of the adhesive monolayer culture cell was carried out over 2 or 3 passages by the recombination retrovirus which carries out the code of 16 HPVE6 and the E7 transformation protein, and, as a result, 16 long-term epithelial cell sequences arose. Four pieces are [the seminal vesicle origin and ten pieces of the normal prostate gland origin and two pieces] the primary cancer sample origins among those. Furthermore, the non-death fibrocyte sequence generated from four patients' prostate gland stroma was established. A success of a transformation was checked compared with the rate of cell survival in the inside of G418 of 1mg [/ml] concentration, and the non-immortalization cultured cell observed by coincidence with the increment in the rate of cell survival more than 50 culture passage, and the speed of growth (drawing 1 A). Under the microscope, no immortalization prostate gland epithelial cell sequences were based on the good nature organization origin or the malignant organization origin, but showed the same gestalt. That is, the gestalt of a cultured cell does not become an index for distinguishing a good nature cell from a malignant cell (drawing 1 B). In order to check the epithelium and the prostate gland origin of a cell lineage train of the prostate gland origin, immunocytochemistry analysis was performed to the cell lump of the non-death culture origin increased actively (Table 3). Quantity and low-molecular-weight cytokeratin were discovered by all the epithelial cell sequences generated at this laboratory containing the thing of the normal prostate gland origin, the normal seminal vesicle origin, and the prostate gland neoplasm sample origin. 75% or more of cell was dyed by on-the-strength 4+ comparable as dyeing observed by the metastatic prostate gland tumor cell sequences DU [LNCaP and] 145, PC-3, and TSU-Pr1 which were established. That is, the epithelium origin of these culture was corroborated. Any significant cytokeratin manifestations were not observed in the fibrocyte sequence or black tumor cell of contrast.

Although it was shown by the cytokeratin manifestation positivity that the cell lineage train generated from the primary prostate gland neoplasm sample is the hide origin as a matter of fact, it was important similarly to inspect the manifestation of the prostate gland related protein PSA and PAP by these cultured cells. Only the non-death prostate gland neoplasm origin cell lineage train (1519-CPTX) generated from the patient 1519 discovered after 5 culture passage on the level which can detect these protein (each, cell dyeing of >75% on-the-strength 2-3+, and cell dyeing of >75% on-the-strength 4+). However, after 30 culture passage, the manifestation of PSA and PAP was not detected any longer in 1519-CPTX. Furthermore, in the anaphase of the passage of this cell lineage train, the manifestation was not guided with IFN-5-aza--2'-deoxycytidine or a dihydroxy testosterone. From immunohistochemistry-assay of the prostate gland neoplasm tissue intercept with which it was fixed for the manifestation of PSA and PAP, some cancer focuses which do not show the manifestation in which dyeing of the weak heterogeneity of cancer carbonization and what kind of detection of these protein are often possible, either were seen. On the contrary, all the normal glands in the fractionation under the same microscope were dyed homogeneously strongly about PSA and PAP (drawing 2). The weak heterogeneous manifestation of PSA and PAP in the living body [by the prostate gland tumor cell] (in situ) can explain that a manifestation is not seen in an immortalization prostatic cancer origin cell lineage train. However, that there is no manifestation does not correlate with the strong manifestation observed by corresponding organization fractionation by the good nature prostate gland epithelial cell sequence, but it is suggested that the deficit of a manifestation of PSA and PAP may be produced also as a result of the cell culture within a test tube.

Assay of chromosome 8p about LOH in the organization in which microdissection was carried out As mentioned above, in many cases, the "prostate gland neoplasm" cell lineage train of this invention originates in the organization sample containing the mixture of a benign and malignant cell type as a matter of fact (drawing 2). All the cultured cells needed the transformation in a retrovirus, in order to guide long-term growth, and use of LOH analysis was developed as a method of substituting for the property decision of the cultured cell which generated.

newly the benign and malignant prostate gland epithelial cell by which the transformation was carried out also in gestalt since it was undistinguishable also in histochemistry. In the cancer focus or normal epithelial cell by which microdissection was carried out, LOH on chromosome 8p12-21 was inspected from the fresh organization intercept which corresponds first. It was chosen in order that (19) it is indicated to be to detect LOH of a high rate in the prostate gland neoplasm sample by which microdissection was carried out, and the panel which eight micro satellite markers attached might identify chromosome 8p deletion. The panel of eight micro satellite markers can identify the deletion of the loci 11-21 of a chromosome 8, as shown in drawing 3.

By assuming that the cell which has normal appearance under a microscope contains LOH as a precursor of neoplastic transformation, it was used as normal contrast for LOH analysis of fresh PBL of the self-origin by which cold storage was carried out. What is being done for the heterojunction by 4 or eight loci or more by which all six patients were inspected by analysis of fresh DNA of the PBL origin (information is given) was shown. However, about two patients (1519 and 1532), the cancer sample by which microdissection was carried out did not show the proof of LOH, but LOH analysis being useful to the property decision of the cultured cell originating in these samples, and not obtaining was suggested (Table 4).

Table 4 LOH on chromosome 8p in the microdissection focus of prostate gland neoplasm or good nature

患者 検査された		染色体8p上の位置							
番号	病巣数	SFTP-2	D8S133	D8S136	NEFL	D8S137	D8S131	D8S339	ANK
1510									
癌	2	●	●	●	—	●	—	●	●
正常	3	●	●	●	—	●	—	●	●
1512									
癌	1	—	●	●	●	nd	—	●	nd
正常	1	—	○	○	○	nd	—	○	nd
1519									
癌	1	—	○	○	○	—	○	○	○
正常	1	—	○	○	○	—	○	○	○
1532									
癌	8	—	○	○	○	nd	—	○	nd
正常	1	—	○	○	○	nd	—	○	nd
1535									
癌	6	●	●	●	●	—	●	○	—
正常	1	○	○	○	○	—	○	○	—

Maintenance of heterozygosity (O)

The deletion (—)
 non-information target of heterozygosity (homozygosity allele) (—)

In-determining (nd).

On the contrary, the neoplasm in which microdissection was done by patients 1510 and 1512 showed LOH in all the inspected information seating positions. About the patient 1535, six separate cancer focuses by which microdissection was carried out were inspected, and all showed the same pattern of LOH. 16 by which a pattern which is different about LOH was shown from the LOH analysis of the cancer of different 12 in which

microdissection was done to the interesting thing by the patient 1542, and four were inspected 12 inside — maintenance of all information alleles was shown (Table 5). The normal epithelium by which microdissection was carried out did not show the proof of LOH on chromosome 8p by making the sample of the patient 1510 origin into an exception. All of three "normal" focuses to which microdissection of the patient 1510 origin was carried out show big LOH which was in agreement with the pattern of LOH observed from the cancer of the self-origin, and the importance of using PBL as normal contrast for this kind of research is emphasized.

Table 5 It can set in the prostatic glandular tissue and the immortalization cell lineage train of the patient 1542 origin by which microdissection was carried out. LOH on ***** 8p

染色体8p座位

細胞原	D8S133	D8S136	D8S137	D8S131
-----	--------	--------	--------	--------

顕微解剖されたフォーカス

正常上皮		NL	NL	NL	NL
癌	1	LL	LL	LL	LL
	2	nd	nd	NL	NL
	3	LL	LL	LL	LL
	4	NL	NL	NL	NL
	5	LL	LL	NL	NL
	6	NL	NL	NL	NL
	7	LU	LU	LU	LU
	8	NL	NL	NL	NL
	9	LU	nd	NL	NL
	10	LL	LL	NL	NL
	11	LU	LL	NL	NL
	12	NL	LL	LL	NL

培養細胞系列

NPTX	(p20) ^a	NL	NL	NL	NL
CP ₃ TX	(p3, 6, 13)	NL	NL	NL	NL
CP ₃ TX clone 1 ^d	(p8)	LL	LL	nd	LL
clone 3 ^b	(p8)	nd	NL	nd	NL
clone 4 ^c	(p8)	LU	LU	nd	LU
CP ₃ TX	(p21)	LU	LU	LU	LU
CP ₃ TX clone ^c	(p23)	LU	LU	LU	LU

With no LOH (NL)

Deletion of up allele (LU)

Deletion of lower allele (LL)

Un-determining (nd).

a continuous culture passage number

LOH analysis of the immortalization cell lineage train of the representation d clone 1542-CP3TX.8.1e clone 1542-CP3TX.8.4 patient 1542 origin of each representation c30 piece clone of each b7 ** clone The deficit of the heterozygosity of the cell culture produced from the patient 1542 is interesting especially in the light of various patterns of LOH which appeared in the cancer focus from which 12 differs, and by which microdissection was carried out. This patient shows information about D8S133, D8S136, D8S137, D8S131, D8S339, and ANK. In four of these seating positions, it inspected in the detail about the deletion of the allele in cancer, a normal prostate gland, a normal seminal vesicle, and the cultured cell of the normal fibrocyte origin (Table 5). From analyzing repetitively the mass culture (passages 3, 6, and 13) of the initial passage of the cancer origin shown as 1542-CP3TX, LOH was seen about neither of four inspected micro satellite markers. However, 1542-CP3TX showed the deletion of up allele in all four inspected locations after 21 continuous-culture passage (about six months). This deletion pattern was the same as the pattern seen in the cancer location of No. 7 by which microdissection was carried out. It was generated from the passage 23 of 1542-CP3TX, and the LOH pattern as non-cloning anaphase subculture and the cancer of No. 7 by which microdissection was carried out with the same all was shown, and the single cell clone of 30 is a clone of an extensive anaphase passage cell lineage train, or showed the presentation near a clone. Failure in the detection of LOH in the initial passage of 1542-CP3TX suggests existence of two or more cancer clones with a different pattern in mass culture, and these knowledge is considered that detection of LOH in the approach based on PCR was checked again. In order to investigate this, the single cell clone was generated from the initial passage (passage 8) of 1542-CP3TX, and LOH was inspected (drawing 4). Seven of nine clones did not show LOH in D8S136 or D8S131 like three pieces among 12 in the cancer to which microdissection of the patient 1542 origin was carried out. However, one clone (clone 4) (1542-CP3TX.8.4) showed the cancer of No. 7 by which microdissection was carried out, the anaphase passage of 1542-CP3TX, and the pattern of the descendant clone and the same pattern of LOH, and it was suggested that the cancer clone which occupies many under anaphase passage mass culture existed in the early culture passage very much clearly. Having been observed about other eight initial passage clones showed a different LOH pattern to the interesting thing, and the deletion of the lower allele of D8S133, D8S136, and D8S131 followed the clone 1 (1542-CP3TX.8.1) of the initial passage 1542-CP3TX origin on it. This is in agreement with the LOH pattern detected in two cancers (No. 1 and No. 3) by which microdissection was carried out again. being careful — it is that LOH was not detected in the repetitive experiment using the immortalization culture normal prostate gland epithelium of the early stages of the patient 1542 origin, and an anaphase passage, a seminal vesicle, or fibrocyte. It becomes the counterevidence to possibility that this will say that LOH observed in the cell derived from cancer was an artifact by culture.

Inspection of LOH of the chromosome eight p12-21 in the cultured cell of the patient origin of the five remainder in patients 1510 and 1512, LOH was detected in many seating positions in the cancer sample by which microdissection was carried out (Table 4). However, the immortalization epithelium cultured cell generated from the corresponding cancer content preparation did not show LOH, when examined on extensive level by the first stage or anaphase culture passage. Similarly, the clone (about a passage 23 and 1512-CPTX, it is [CPTX / 1510-] a passage 31) which grew from the anaphase culture passage did not show the proof of LOH. The normal prostate gland epithelium of amount with this most to the preparation of the basis by which these culture was produced existing (Table 2), and the inside of a test tube are reflecting that a normal cell carries out superfluous growth. Carrying out cloning of these cell lineage trains by the early culture passage very much may induce many valuable results more.

Inspection of the cancer focus to which microdissection of a patient 1519 (one focus) and the 1532 (eight focuses) origins was carried out did not show LOH (Table 4). Nevertheless, the cultured cell established from these neoplasms was evaluated about LOH. In the case of the patient 1519, maintenance of heterozygosity was shown by six inspected information seating positions from inspection of mass culture 1519-CPTX. However, seating position D8S133 with single one showed LOH among the single cell clones of 11 of the culture passage 24 origin. As for the hook, in the case of the patient 1532, mass culture sequence 1532-CP2TX (Table 2) generated from one of two acquired cancer samples showed LOH to (the passage 24) in D8S133, D8S136, and NEFL only for after culture of long duration. No less than all ten clones generated from the anaphase culture passage showed the same deletion pattern. However, one of the immortalization cultured cells of the normal prostatic glandular tissue

origin of the patient 1532 origin did not show the proof of LOH after 20 culture passage. Similarly, the immortalization fibrocyte sequence of the self-origin held the heterozygosity in the three same alleles as having been lost in 1532-CP2TX. That is, it is suggested that LOH which exists in the neoplasm focus in the living body (in situ) which was not dissected for analysis of these results from LOH observed by a single 1519-CPTX clone and single 1532-CP2TX may be reflected.

The interesting result was obtained by the cultured cell of the patient 1535 origin. In this case, extensive LOH was shown in six separate cancer focuses by which microdissection was carried out, and all showed the deletion of the same pattern (Table 4). The cultured cell of the first stage generated from a prostate gland neoplasm and an anaphase passage did not show LOH like the thing of the normal prostate gland origin and the normal seminal vesicle origin. Similarly, the cancer clone of 11 generated by the culture passage 27 did not show deletion. However, one clone which has the LOH pattern which suits six cancer disease blow holes by which microdissection was carried out by cloning of initial passage cancer culture (passage 12) became clear (clone 1535-CP1TX.14.3). These results show that initial cloning of the immortalization cultured cell histologically generated from the heterogeneous prostate gland neoplasm sample is required, in order to reproduce the result observed by the patient 1542 and to obtain a pure cancer cultured cell.

Manifestation of the MHC molecule by the immortalization cell lineage train of the prostate gland neoplasm origin inspection of a manifestation of the front face MHC in an immortalization cancer origin cell lineage train is important in order to take into consideration the potential usefulness of these sequences for immunological research. When opted for the culture originating in all six patients by flow cytometry, it discovered the front face MHC class I of a significant quantity, and adhesion-molecules ICAM-1 (Table 6).

Table 6: Manifestation by cell surface of MHC by immortalization prostate gland epithelial cell sequence, and

患者番号	細胞原	%陽性細胞		
		MHC classI	MHCclassII	ICAM-1
1510	F	96	1	57
	CP	90	2	22
1512	NP	100	10	43
	CP	97	6	35
1519	CP	92	3	40
1532	NP	88	1	50
	CP ₁	89	4	65
	CP ₂	95	1	74
1535	NP	78	0	44
	SV	96	1	80
	CP ₁	99	1	60
	CP ₂	82	1	50
1542	F	87	1	58
	NP	63	2	65
	SV	69	1	87
	CP ₁	71	1	66
	CP ₂	72	1	73

adhesion molecules

JP, 40 3 64

what kind of thing of the sequence by which immortalization was carried out — the costimulatory molecule (B7.1, 37.2) of MHC class II or B7 family — neither was discovered on detectable level. However, it is interesting to determine whether as reported by the melanoma cell lineage train before, upper control of the manifestation of (29) and an MHC molecule can be carried out under existence of IFN-gamma. The cancer to which immortalization of the cell lineage train 1532-CP2TX, 1535-CP1TX, and 1542-CP3TX origin was carried out was cultivated under existence of 500U/ml IFN-gamma for 72 hours, and the manifestation of MHC was inspected after that. All had the manifestation of the MHC class II molecule of a significant quantity guided. The manifestation of a MHC class I molecule was also reinforced in comparison with the contrast which furthermore is not processed (comparison of drawing 5 C and 5A). These immortalization cancer origin cell lineage trains are one of the useful reagents potentially because of research of CD4+ [in / in the light of this / the patient of a prostate gland primary malignant tumor], and a CD8+ cell medium nature immune response, or a stimulus.

HLA mold decision of a prostate gland epithelial cell sequence An HLA mold decision was made about each patient in whom a prostate gland epithelial cell sequence originates. A, B, and C mold were determined by the human serum protein type decision of the lymphocyte using an approach known by the technical field concerned. DR and DQ mold were determined by the genotype decision of the lymphocyte using a standard approach. The result of an HLA mold is shown in Table 7.

Table 7 HLA mold of prostate gland epithelial cell sequence

患者番号	A	B	Cw	DRB1*	DQB1*	DRB
1510	29, 31	44, 60	3, -	0401, 07	0201, 0302	4* 0101
1512	3, -	7, -	7, -	1501, -	0602, -	5* 0101
1519	24, 32	14, 44	5, 8	0701, 1301	0201, 0603	3* 0101 4* 0101
1532	1, -	8, 57	6, 7	0301, 04	0201, 0301	3* 0101 4* 0101
1535	1, 31	7, 37	6, 7	07, 04	0201, 0302	4* 0101
1542	1, 23	50, 70	2, -	0301, 1101	0201, 0301	3* 0202

reference list 1. Parker, S.L., Tong, T., Bolden, S., and Wingo, P.A. Cancer Statistics, 1996. CA Cancer J. Clin, and 35:5- 27 and 1996

2. Isaacs, J.T., Isaacs, W.B., and Schalken, J. Comparative aspects of multistep prostatic carcinogenesis in humans and rodents. Prog. Clin.

Biol. Res., 376:261-288, 1992.

3. Webber, M.M., Chaproniere-Rickenberg, D.M., and Donohue, R.E. Isolation and growth of adult human prostatic epithelium in serum-free, defined medium. In: Methods for serum-free culture of cells of the endocrine system, pp. 47-61. New York: Alan R. Liss, 1984

4. Peehl, D.M. Culture of human prostatic epithelial cells. In: Culture of epithelial cells, pp. 159-180. New York: Wiley-Liss, 1992.

5. Rhim, J.S., Webber, M.M., Bello, D., Lee, M.S., Amstein, P., Chen, L., and Jay, G. Stepwise immortalization and transformation of adult human prostate epithelial cells by combination of HPV-18 and v-Ki-ras. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:11874-11878, 1994.

6. Bondou, P., Cussenot, O., Soliman, H., Villette, J.M., Teillac, P., LeDuc, A., and Fiet, J. Distinct androgen 5 alpha-reduction pathways in cultured fibroblasts and immortalized epithelial cells from normal human adult prostate. J. Urol., 152:226-231, 1994.

7. Lee, M., Garkovenko, E., Yun, J.S., Weijerman, P.C., Peehl, D.M., Chen, L., and Rhim, J.S. Characterization of adult-

- human-prostatic epithelial-cells-immortalized by-polybrene-induced DNA transfection with a plasmid containing an origin-defective-SV40genome.Int.J.Oncol. and 4:821- 830 and 1994
8. Weijerman,P.C.,Koenig-J.J.,Wong,S.T.,Nieters,G.M.,and-Peehl,D.M.Lipofection-mediated-immortalization-of-human-prostatic-epithelial-cells-of-normal-and-malignant-origin-using-human-papillomavirus type 18 DNA.Cancer Res.,54:5579-5583,1994.
 9. Brothman,A.R.,Peehl,D.M.,Patel,A.M.,and McNeal,J.E.Frequency and pattern of karyotypic abnormalities in human prostate cancer.Cancer Res.,50:3795-3803,1990.
 10. Brothman,A.R.,Peehl,D.M.,Patel,A.M.,MacDonald,G.R.,McNeal,J.E.,Ladaga,L.E.,and Schellhammer,P.F.Cytogenetic evaluation of 20 cultured primary prostatic tumors.Cancer Genet.Cytogenet.,55:79-84,1991.
 11. Brothman,A.R.,Patel,A.M.,Peehl,D.M.,and Schellhamner,P.F.Analysis of prostatic tumor cultures using fluorescence in-situ hybridization(FISH).Cancer Genet.Cytogenet.,62:180-185,1992.
 12. Isaacs,W.B.,Bova,G.S.,Morton,R.A.,Bussemakers,J.D.,and Ewing,C.M.Molecular biology of prostate cancer.Seminars in Oncology,21:514-521,1994.
 13. Carter,B.S.,Ewing,C.M.,Ward,W.S.,Treiger,B.F.,Aalders,T.W.,Schalken,J.A.,Epstein,J.I.,and Isaacs,W.B.Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer.Proc.Natl.Acad.Sci.USA.87:8751-8755,1990.
 14. Bergenheim,U.S.R.,Kunimi,K.,Collins.V.P.,and Ekman,P.Deletion mapping of chromosomes 8,10,and 16 in human prostatic carcinoma.Genes,Chromosomes and Cancer,3:215-220,1991.
 15. Sakar,W.A.,Macoska,J.A.,Benson,P.,Grignon,D.J.,Wolman,S.R.,Pontes,J.E.,and-Crissman,J.D.Allelic loss in locally metastatic,multisampled prostate-cancer.Cancer Res.,54:3273-3277,199416.
 16. Bova,G.S.,Carter,B.S.,Bussemakers,M.J.G.,Emi,M.,Fujiwara,Y.,Kyprianou,N.,Jacobs,S.C.,Robinson,J.C.,Epstein,J.I.,Walsh,P.C.,and Isaacs,W.B.Homozygous deletionand frequentallelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer.Cancer Res. and 53:3869- 3873 and 1993
 17. Trapman,J.,Sleddens.H.F.B.M.,van-der-Weiden,M.M.,Dinjens,W.N.M.,Konig,J.J.,Schroder,F.H.,Faber,P.W.,and Bosman,F.T.Loss of heterozygosity-of-chromosome8microsatellite-loci-implicates-a-candidate-tumor suppressor gene between the loci D8S87 and D8S133 in human prostate cancer.Cancer Res. and 54:6061- 6064 and 1994
 18. Macoska,J.A.,Trybus,T.M.,Benson,P.D.,Sakar,W.A.,Grignon,D.J.,Wojno,K.D.,Pietruk,T.,and Powell,I.J.Evidence for three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer.Cancer Res.,55:5390-5395,1995.
 19. Vocke,C.D.,Pozzatti,R.O.,Bostwick,D.G.,Florence,C.D.,Jennings,S.B.,Strup,S.E.,Duray,P.H.,Liotta,L.A.,Emmert-Buck,M.R., and-Linehan,W.M.Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21.Cancer Res. and 56:2411- 2416 and 1996
 20. Emmert-Buck,M.R.,Vocke,C.D.,Pozzatti,R.O.,Duray,P.H.,Jennings,S.B.,Florence,C.D.,Zhuang,Z.,Bostwick,D.G.,Liotta,L.A., and-Linehan,W.M.Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia.Cancer Res.,55:2959- 2962 and 1995
 21. Topalian,S.L.,Muul,L.M.,Solomon,D.,and Rosenberg,S.A.Expansion of human infiltrating lymphocytes for use in immunotherapy trials.J.Immunol.Meth.,102:127-141,1987.
 22. Halbert,C.L.,Demers,G.W.,and Galloway,D.A.The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells.J.Virol.,65:473-478.1991.
 23. Topalian,S.L.,Solomon,D.,Avis,F.P.,Chang,A.E.,Freerksen,D.L.,Linehan,W.M.,Lotze,M.T.,Robertson,C.N.,Seipp,C.A.,Simor Simpson,C.G.,and-Rosenberg,S.A.Immunotherapy of patients with-advanced-cancer-using-tumor-infiltrating lymphocytes-and-recombinant interleukin-2:Apilot study.J.Clin.Oncol. and 6:839- 853 and 1988
 24. Emmert-Buck,M.R.,Roth,M.J.,Zhuang,Z.,Campo,E.,Rozhin,J.,Sloane,B.F.,Liotta,L.A.,Stetler-Stevenson,W.G.Increased-gelatinase-A-and-cathepsin-B-activity-in-invasive-tumor-regions-of-human-colon-cancer-samples.Am.J.Pathol.,154:1285-1290,1994.
 25. Zhuang,Z.,Berttheau,P.,Emmert-Buck,M.R.,Liotta,L.A.,Gnarra,J.,Linehan,W.M.,Lubensky,I.A.A-new-microdissection-technique-for-archival-DNA-analysis of specific cell populations-in-lesions-less-than-one-millimeter.Am.J.Pathol.,146:620-625,1995.
 26. Zhuang,Z.,Merino,M.J.,Chuaqui,R.,Liotta,L.A.,and Emmert-Buck,M.R.Identical allelic loss on chromosome 11q13 in microdissected in situ and invasive human breast cancer.Cancer Res.,55:467-471,1995.
 27. Hung,T.,Mak,K.,and Fong,K.A.A specificity enhancer for polymerase chain reaction.Nucleic Acid Res.,18:4953,1990.
 28. Litt,M.,Hauge,X.,and Sharma,V.Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats:some causes

and cures. *Biotechniques*, 15:280-284, 1993.

29. Markus, N.R., Rosenberg, S.A., and Topalian, S.L. Analysis of cytokine secretion by melanoma-specific CD4+T lymphocytes. *J. Interferon Cytokine Res.*, 15:739-746, 1995.
30. Burrows, M.T., Burns, J.E., and Suzuki, Y. Studies on the growth of cells. The cultivation of bladder and prostatic tumors outside the body. *J. Urol.* 1:3, 1917.
31. Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., and Murphy, G.P. LNCaP model of prostatic carcinoma. *Cancer Res.*, 43:1809-1818, 1983.
32. Henttu, P., Liao, S., and Vihko, P. Androgens up-regulate the human prostate specific antigen messenger-ribonucleic acid (mRNA), but down-regulate the prostatic acid-phosphatase mRNA in the LNCaP cell-line. *Endocrinology*, 130:766-772, 1992.
33. Cooney, E.L. et al 1991 *Lancet* Vol. 337:567.
34. Wolff, J.A. et al 1990 *Science* Vol. 247:1465.
35. Davis, H.L. et al 1993 *Hum. Gene Ther.* Vol. 4:151.
36. Yang, N.S. et al 1990 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 87:9568.
37. Williams, R.S. et al 1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 88:2726.
38. Fynan, E.R. et al 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 90:11478.
39. Eisenbraun, M.D. et al 1993 *DNA and Cell Biol.* Vol. 12:791.
40. Fuller, D.H. et al 1994 *AIDS Res. Hum. Retrovir.* Vol 10(II):1433.
41. Acsadi, G. et al 1991 *Nature* Vol. 352:815.
42. Matteucci, M.D. et al 1996, *Nature* vol. 384:20-22.
43. Perkus et al *Science* 1985 Vol. 229:981-984.
44. Kaufman et al *Int. J. Cancer* 1991, Vol. 48:900-907.
45. Moss *Science* 1991 Vol. 252:1662.
46. Smith and Moss *BioTechniques* Nov/Dec 1984, p. 306-312.
47. U.S. Patent No. 4,738,846.
48. Sutter and Moss *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992 Vol. 89:10847-10851.
49. Baxby and Paoletti *Vaccine* 1992 Vol. 10:8-9.
50. PCT International Publication No. WO94/16716 published August 4, 1994.
51. *Short Protocols in Molecular Biology*, 3rd ed. F. Ausubel et al, eds. John Wiley & Son, Inc., 1995.
52. *Basic Methods in Molecular Biology*, 2nd ed. L. Davis et al, eds. Appleton & Lange, 1994.

配列表

(2) 配列情報 SEQ ID NO:1:

(i) 配列の特性:

- (A)長さ: 19塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:1:

GAGCCCAGAC AGGCTGGA 19

(3) 配列情報 SEQ ID NO:2:

(i) 配列の特性:

- (A)長さ: 21塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:2:

ACTTTTCTGG CCAAATCCT G 21

(4) 配列情報 SEQ ID NO:3:

(i) 配列の特性:

- (A)長さ: 20塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:3:

CAGGTGGGAA AACTGAGGGA 20

(5) 配列情報 SEQ ID NO:4:

(i) 配列の特性:

- (A)長さ: 22塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:4:

AGCAACTGTC AACATATTGC TC

22

(6) 配列情報 SEQ ID NO:5:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 19塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:5:

GCCCAAAGAG GAGAATAAA

19

(7) 配列情報 SEQ ID NO:6:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 18塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:6:

CTGTTTCAC ACCGAAGC

18

(8) 配列情報 SEQ ID NO:7:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 20塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:7:

GCAGTAGTGC CGCAGTTTCA

20

(9) 配列情報 SEQ ID NO:8:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 20塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:8:

TGCAATTCAT CTCCTTTCT

20

(10)配列情報 SEQ ID NO:9:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 22塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:9:

AAATACCGAG ACTCACACTA TA

22

(11)配列情報 SEQ ID NO:10:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 21塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:10:

GCTAATCAGG GAATCACCCA A

21

(12)配列情報 SEQ ID NO:11:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 22塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:11:

ACATAGGCTG GAGAGTCACA GG

22

(13)配列情報 SEQ ID NO:12:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 22塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:12:

GGATGAGGCT CAGCACACAA GC

22

(14)配列情報 SEQ ID NO:13:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 18塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:13:

TAGATGTTAC CATTTAC

18

(15)配列情報 SEQ ID NO:14:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 18塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:14:

GATTAGATCT TGGATCAG

18

(16)配列情報 SEQ ID NO:15:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 20塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:15:

TCCCAGATCG CTCTACATGA

20

(17)配列情報 SEQ ID NO:16:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 20塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:16:

TACAGCTTCA GAAGTCACAG

20

[Translation done.]

* NOTICES *

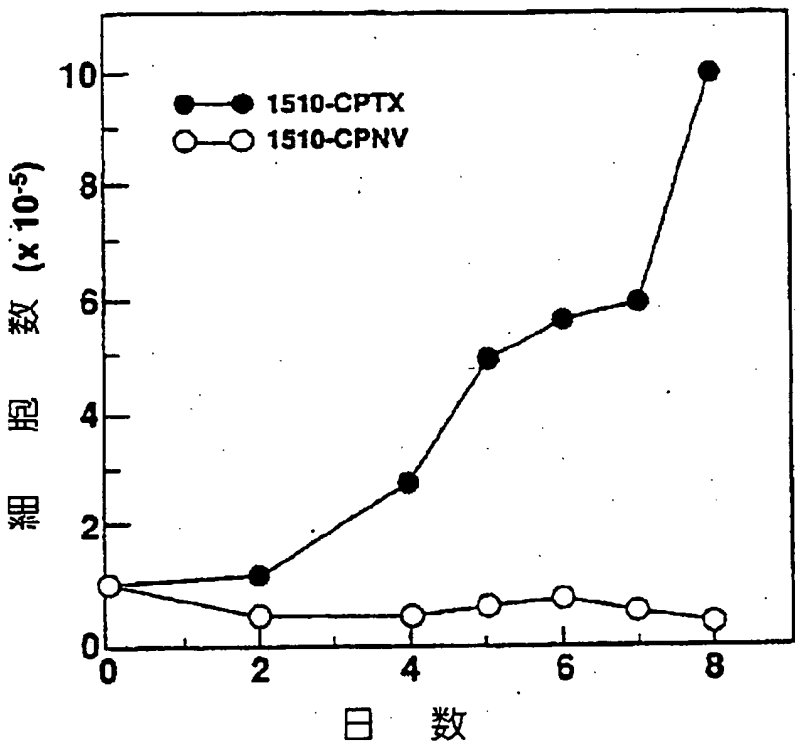
JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

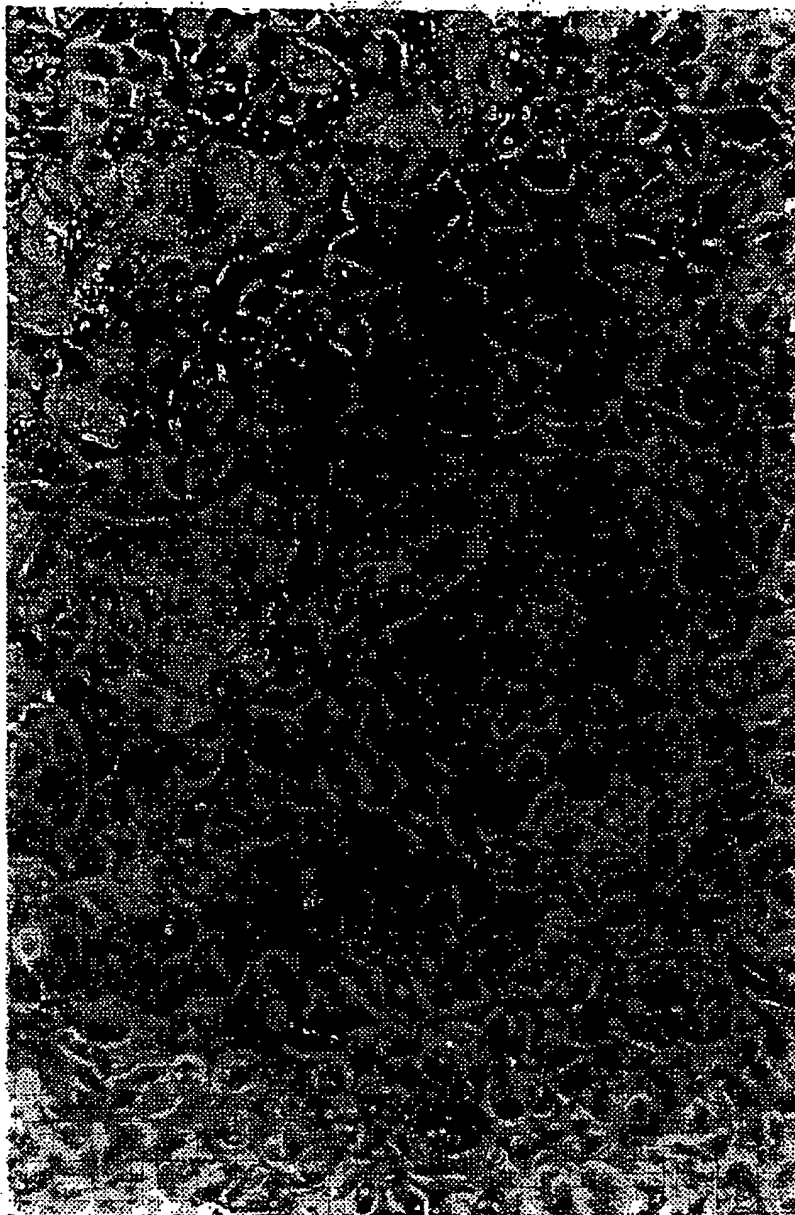
[Drawing 1]

FIGURE 1A



[Drawing 1]

FIG. 1B



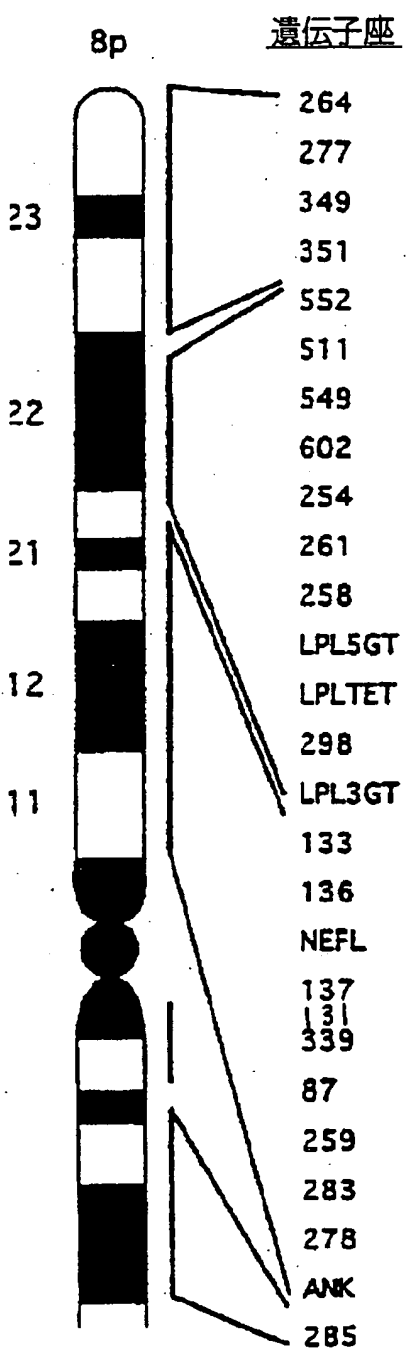
Drawing 2]

FIG. 2



Drawing 3]

FIGURE 3

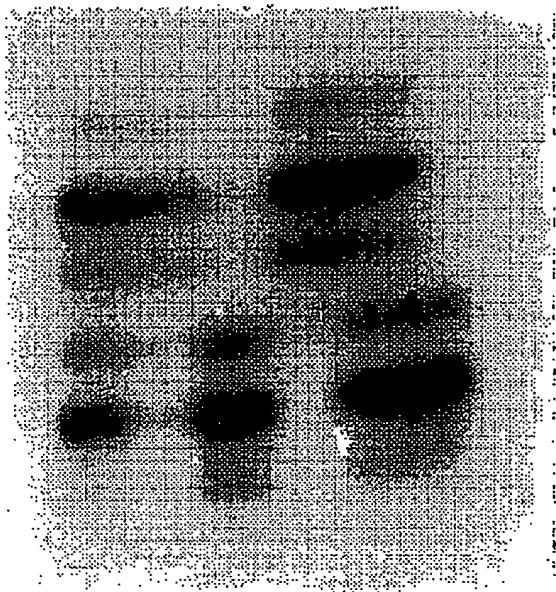


[Drawing 4]

FIG. 4

D8S136

1 2 3 4 5 6



Drawing 5]

FIG. 5A

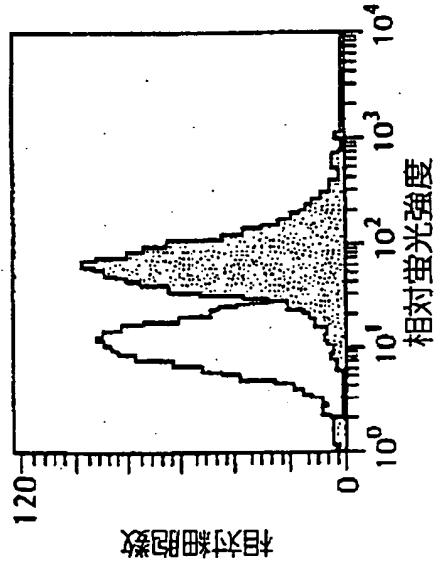


FIG. 5C

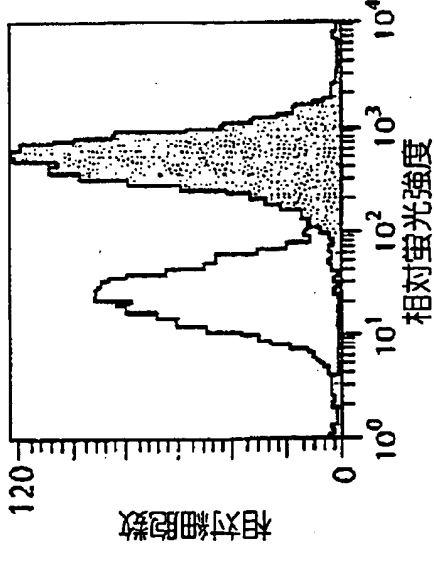


FIG. 5E

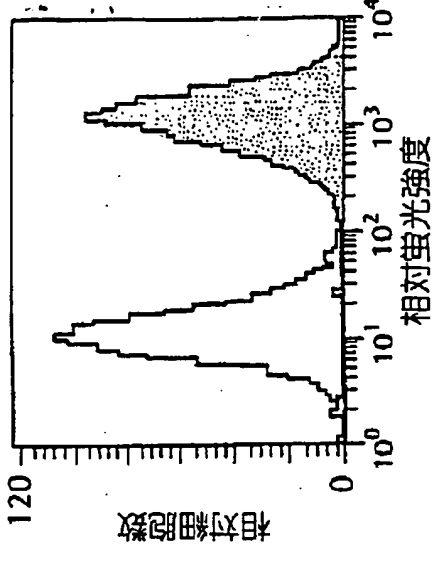


FIG. 5B

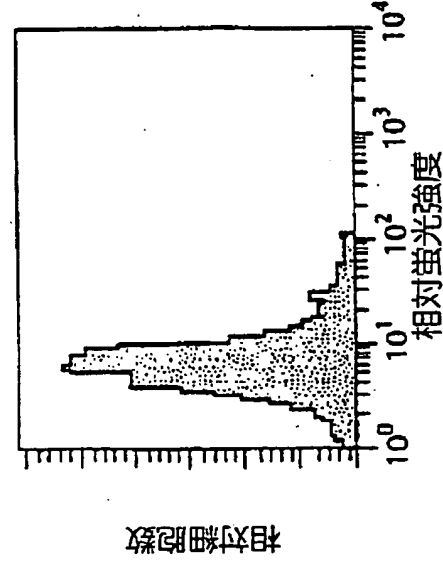


FIG. 5D

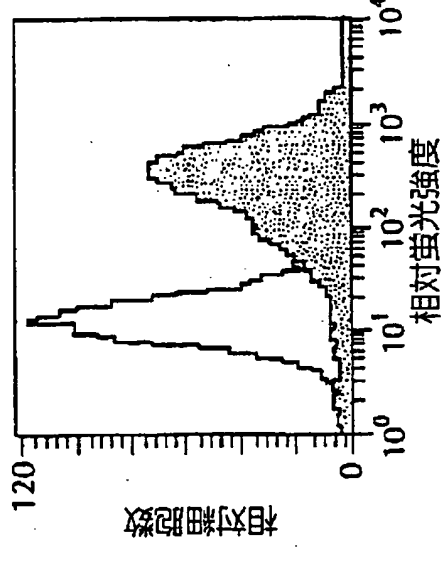
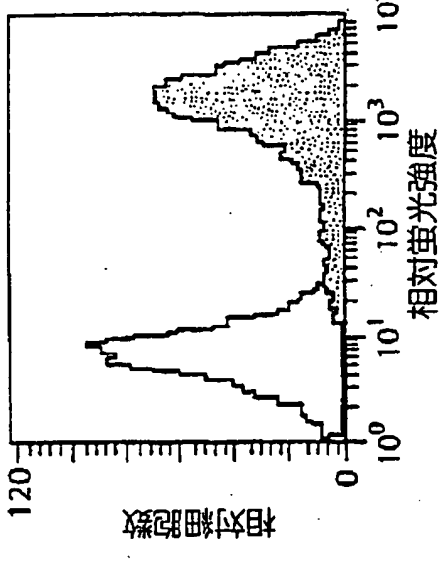


FIG. 5F



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-506379

(P2000-506379A)

(43) 公表日 平成12年5月30日 (2000.5.30)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	マーク (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15		33/531	A
33/531		C 1 2 N 5/00	B
		審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 59 頁)

(21) 出願番号 特願平9-527794
(86) (22) 出願日 平成9年1月30日 (1997.1.30)
(85) 翻訳文提出日 平成10年8月3日 (1998.8.3)
(86) 国際出願番号 PCT/US 97/01430
(87) 国際公開番号 WO 97/28255
(87) 国際公開日 平成9年8月7日 (1997.8.7)
(31) 優先権主張番号 60/011, 042
(32) 優先日 平成8年2月2日 (1996.2.2)
(33) 優先権主張国 米国 (US)
(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L U, MC, NL, PT, SE), CA, JP, US

(71) 出願人 アメリカ合衆国
アメリカ合衆国メリーランド州20852, ロックヴィル, エグゼクティブ・ブールバード 6011, スウィート 325, ナショナル・インスティテューツ・オブ・ヘルス, オフィス・オブ・テクノロジー・トランスファー
(72) 発明者 トバリアン, スザンヌ・エル
アメリカ合衆国メリーランド州20833, ブロックヴィル, ジェームズ・クリーク・コート 19400
(74) 代理人 弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト前立腺上皮不死細胞の細胞株およびクローンおよびそれらの研究および前立腺癌治療に対する応用

(57) 【要約】

本発明は、不死化された、悪性ヒト先人前立腺上皮細胞株またはそれから誘導された前立腺癌の診断および治療に有用な細胞株に関する。より具体的には、本発明は、クローン化され、不死化された、胚生のヒト成人前立腺上皮細胞株および癌の診断および治療のためのこれらの細胞株の使用に関する。さらにまた、本発明は特異的染色体性欠失の分析によるこれら細胞株の特性決定を提供する。

【特許請求の範囲】

1. 単離され、不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株。
2. ヘテロ接合体性の対立遺伝子欠失を少なくとも一つ有することを特徴とする、請求項1の不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株。
3. 対立遺伝子欠失が一つまたはそれ以上の染色体に存在する、請求項2の不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株。
4. 染色体が、染色体1、染色体8、染色体10、染色体16およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項3の不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株。
5. 対立遺伝子欠失が染色体8 p上に存在する、請求項2の不死化された、悪性ヒト前立腺上皮細胞株。
6. 対立遺伝子欠失が染色体8 p 11-21上に存在する、請求項2の不死化された、悪性ヒト前立腺上皮細胞株。
7. 対立遺伝子欠失が一つ以上の座に存在する、請求項2の不死化された、悪性ヒト前立腺上皮細胞株。
8. 欠失が、SFTP-2、D8S133、D8S136、D8S131、NEFL、D8S137、D8S339、ANKおよびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項6の不死化された、悪性細胞株。
9. ATCCにATCC CRL-12263として寄託された、クローン化され、不死化された、悪性前立腺上皮細胞株1535-CP1TX. 14. 3の同定特性を有する、クローン化され、不死化された、悪性前立腺上皮細胞株。
10. ATCCにATCC CRL-12264として寄託されたクローン化され、不死化された、悪性前立腺上皮細胞株1542-CP3TX. 8. 4の同定特性を有する、クローン化され、不死化された、悪性前立腺上皮細胞株。
11. ATCCにATCC CRL-12265として寄託されたクローン化され、不死化された、悪性前立腺上皮細胞株1542-CP3TX. 8. 1の同定特性を有する、クローン化され、不死化された、悪性前立腺上皮細胞株。
12. ATCCにATCC CRL-12263として寄託されたクローン化

され、不死化された、悪性前立腺上皮細胞株1535-CP₁TX. 14. 3。

13. ATCCにATCC CRL-12264として寄託されたクローン化され、不死化された、悪性前立腺上皮細胞株1542-CP₃TX. 8. 4。

14. ATCCにATCC CRL-12265として寄託されたクローン化され、不死化された、悪性前立腺上皮細胞株1542-CP₃TX. 8. 1。

15. ATCCにATCC CRL-12038として寄託された不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株1532-CP₂TX。

16. ATCCにATCC CRL-12041として寄託された不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株1535-CP₁TX。

17. ATCCにATCC CRL-12037として寄託された不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株1542-CP₃TX。

18. A. 一次前立腺腫瘍からの上皮細胞を単離して細胞培養を開始し、
B. 該前立腺上皮細胞を不死化し、
C. 不死化した、悪性成人前立腺上皮細胞株の単一細胞をクローニングし、
D. 悪性前立腺上皮細胞またはクローンについて、ヘテロ接合体性の対立遺伝子欠失を少なくとも一つ有するかを解析する、

ことよる方法により製造される、クローン化され、不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株。

19. 対立遺伝子欠失が、染色体1、8、10、16またはその組み合わせ上に生じる、請求項18のクローン化され、不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株。

20. ATCCにCRL-12036として寄託された不死化された、正常ヒト成人前立腺上皮細胞株1532-NPTX。

21. ATCCにCRL-12039として寄託された不死化された、正常ヒト成人前立腺上皮細胞株1535-NPTX。

22. ATCCにCRL-12040として寄託された不死化された、正常ヒト成人前立腺上皮細胞株1542-NPTX。

23. A) 不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞、および
B) 自己由来の、不死化された、正常ヒト成人前立腺上皮細胞、
を含む組成物。
24. 不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株が、ATCCにCRL-12038として寄託された1532-CP₂TXであり、そして自己由来の、不死化された、正常ヒト成人前立腺上皮細胞株が、ATCCにCRL-12036として寄託された1532-NPTXである、請求項23の組成物。
25. 不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株が、ATCCにCRL-12041として寄託された1535-CP₁TXであり、そして自己由来の、不死化された、正常ヒト成人前立腺上皮細胞株が、ATCCにCRL-12039として寄託された1535-NPTXである、請求項23の組成物。
26. 不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株が、ATCCにCRL-12037として寄託された1542-CP₃TXであり、そして自己由来の、不死化された、正常ヒト成人前立腺上皮細胞株が、ATCCにCRL-12040として寄託された1542-NPTXである、請求項23の組成物。
27. 請求項1ないし22の、不死化された、ヒト成人前立腺上皮細胞株、そのクローン、またはその一部、および薬学的に許容される担体を含んでなる、薬剤組成物。
28. さらに、助剤、共刺激分子、サイトカイン、ケモカイン、接着分子、MHC分子またはそれらの組み合わせを含む、請求項27の薬剤組成物。
29. 請求項1ないし20の、不死化された、ヒト成人前立腺上皮細胞株、そのクローン、またはその免疫原性の部分を含む、前立腺癌タンパク質またはその部分に特異的な免疫応答を誘発するための免疫原。
30. さらに、助剤、共刺激分子、サイトカイン、ケモカイン、接着分子、MHC分子またはそれらの組み合わせを含む、請求項29の免疫原。
31. 免疫応答が細胞介在応答である、請求項29の免疫原。
32. 免疫応答が体液性応答である、請求項29の免疫原。
33. 請求項29の免疫原に免疫反応性を有する抗体。
34. 請求項1ないし22の、不死化された、悪性のヒト成人前立腺上皮細胞

株、そのクローン、またはその一部を含んでなる、前立腺癌ワクチン。

35. さらに、サイトカイン、ケモカイン、共刺激分子、接着分子またはMHC分子をコードする遺伝子の一つまたはそれ以上が該細胞に組み込まれていることからなる、請求項34の前立腺癌ワクチン。

36. 請求項1ないし22の、不死化された、成人前立腺上皮細胞株を、試験すべき剤に暴露して、該剤の該細胞に対する効果を評価することからなる、治療剤候補のスクリーニング方法。

37. 効果が細胞毒性である、請求項36の方法。

38. 効果が細胞増殖の抑制である、請求項36の方法。

39. 請求項1ないし22の、不死化された、成人前立腺上皮細胞株の少なくとも一種を含むキット。

40. A) 不死化された正常細胞株および、

B) 同じ個体由来の不死化された悪性細胞株、

を含む、請求項39のキット。

41. A. 不死化された、ヒト成人前立腺上皮細胞株を単細胞クローニングし、そして

B. 少なくとも一つの染色体に、不死化された悪性ヒト成人前立腺上皮細胞の指標である、少なくとも一つのヘテロ接合性の対立遺伝子欠失を有する細胞を選択する、

ことからなる、供給源から不死化された、悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株を選択する方法。

42. 供給源が前立腺細胞の細胞培養物である、請求項41の方法。

43. 染色体が、1、8、10、16およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項41の方法。

44. 染色体が8pである、請求項43の方法。

45. 欠失が領域8p11-21から選択される少なくとも一つの対立遺伝子上に存在する、請求項44の方法。

【発明の詳細な説明】

ヒト前立腺上皮不死細胞の細胞株およびクローンおよびそれらの研究および前立腺癌治療に対する応用

発明の分野

本発明は不死化された悪性のヒト成人前立腺上皮細胞株に関連する。本発明はまた、それらの細胞株の個々の細胞クローンにも関連する。本発明はさらに対立遺伝子ヘテロ接合性の喪失の解析によって特徴づけられた、不死化された悪性のヒト成人前立腺上皮細胞の細胞株およびクローンにも関連する。とくに、本発明は自家組織の正常および悪性前立腺上皮細胞の細胞株およびクローンおよびそれらの研究への応用に関連する。本発明はまた前立腺癌の診断および治療におけるその細胞の使用にも関連する。

発明の背景

長期のヒト前立腺癌細胞株を *in vitro* で確立することが困難であることは前立腺腫瘍形成の理解および前立腺癌に対する新しい治療法の発達に向けての進歩を阻害してきた。今日まで転移損傷から生成された4つの前立腺癌細胞株だけが前立腺腫瘍形成を制御している生物学および分子的なことから関する生体内での実験の大部分に対する基礎を提供してきた。従って、長期の前立腺癌細胞株が確立されることは学術的、診断的、および治療的に大きな必要性がある。

近年、前立腺癌は米国の男性において最も一般的診断される癌となってきた。本年だけでも、新規の前立腺癌は300,000件近く、40,000件以上が死亡していると思われており、癌の致死率は肺癌に続いて2位となっている(1)。前立腺癌による死亡は主に転移した疾患に起因しているにも関わらず、新しく診断された患者の60%近くは局在した一次腫瘍を有している。局在した疾患に対しては外科手術および放射線治療がしばしば有効であるが、伝播した転移性の疾患は多くの場合治療不能である。あらゆる科学的努力にも関わらず、前立腺癌の発生及び進行を引き起こす生物学的な事柄に関しては比較的僅かしか知られていない。前立

腺癌の治療のための新しい方策の発達には一次前立腺癌の形成及びその転移の進行に関与する細胞および分子的な事柄に対する理解の向上が必要である。

転移性の損傷から生成された4つのヒト前立腺癌細胞株(LNCaP, DU145, PC-3, TSU-Pr1)は大部分の前立腺癌に関する生体内での実験の基盤を提供してきた。一次(非転移性)前立腺癌から短期の細胞株を生体外で培養するための大きな進歩がなされた。それらの進歩は培液の発達および新鮮な組織の調製および前立腺上皮細胞の培養技術の改良を含む(3,4)。しかしながら、一次腫瘍由来の長期のヒト前立腺上皮細胞株の確立及びその維持は、生体外での不死化ができない限り不可能であった。そのために、長期的不死化した細胞株を記載した報告は僅かであり、それらは正常な前立腺上皮の培養に限られていた(5,6,7,8)。従って本研究の目標は一次腫瘍に由来する永続的に分裂する前立腺癌細胞株を生成するための信頼できる方法を確立することであった。

さらに、不死前立腺上皮細胞株の確立に固有の困難なことは、正常な上皮細胞と培養された前立腺癌細胞を区別することに伴う問題である。複数の短期前立腺上皮培養細胞に関する過去の細胞遺伝学的な見積りによって局在した前立腺癌から生じた細胞株の大部分は正常な男性の核型を示すことが明らかにされた(9,10,11)。このことは、短期培養細胞の顕微鏡形態の顕著でないこと、および異種移植の完全な不成功とあわせて、ヒト一次前立腺癌細胞の同定及び特徴付けを極度に困難にしていた。

前立腺癌の発生は対立遺伝子の染色体欠失によって表れる潜在的な癌抑制遺伝子の不活化を含む細胞内の複数の遺伝的变化の結果として起こると信じられている(12に解説されている)。新鮮な(培養されていない)一次前立腺癌標本における染色体欠失を調べた初期の研究は染色体10qおよび16q上の対立遺伝子ヘテロ接合性の消失(allelic loss of heterozygosity, LOH)を示している(13,14,15)。それに続く研究は8番染色体短腕上に顕著に高い頻度で対立遺伝子の消失があることを示しており、従って前立腺癌に関連した腫瘍抑制遺伝子の位置の候補のリストの上位に染色体8pはなっている(16,17,18)。さらに、近年の99の微小切除された腫瘍(19)および54の微小切除されたPIN損傷(20)についての、染色体8pの短腕上におけるLOHの調査は、相当する正常な対照群と比べて染色体8p12-21上の腫瘍

抑制遺伝子(群)の不活性化の強力な証拠を示した。従って、染色体8p12-21上の

この小さな欠失領域内のLOHを調べることは一次腫瘍に由来するヒト前立腺上皮細胞株の同定および特徴付けのための強力な代替的方法になりうる。

本発明は一次前立腺腫瘍に由来する複数のヒト腫瘍細胞株の生成の成功および特徴的な遺伝学的解析である。

発明の概要

本発明は腫瘍性および正常の前立腺組織に由来する長期のヒト上皮細胞株の単離、不死化、および解析および、これらの細胞株の研究及び前立腺癌治療における応用を提供する。とくに、本発明の目的は、悪性および良性の自家標本の両方に由来する無限増殖能を持った前立腺上皮細胞株を用いて達成された。

本発明の細胞株は上皮細胞腫瘍形成のモデルとして有用である。例えば、本発明の不死化した前立腺上皮細胞株はとくに前立腺癌の腫瘍形成の理解のために有用である。本発明は不死化した良性の成人前立腺細胞株を、不死化した自家性の悪性成人前立腺細胞株とともに、良性から悪性の細胞表現型への変化を引き起こす遺伝学的な出来事を決定することおよび、前立腺癌における遺伝の役割を調べるための試薬として使用することを提供する。

本発明は単離された不死化した悪性のヒト成人前立腺上皮細胞株である。本発明のもう一つの側面は、少なくとも一つの対立遺伝子ヘテロ接合性の消失(LOH)をもつものとして特徴付けられたクローン化された不死化した悪性の成人前立腺上皮細胞株である。本発明のさらなる側面は染色体1、8p、10および/または16上の一つまたはそれ以上の対立遺伝子の消失をもつものとして特徴づけられたクローン化された不死化した悪性のヒト成人前立腺細胞株である。

本発明の細胞株は前もって選択されたタンパク質を生成する方法及び上皮細胞起源のタンパク質を生成する方法において利用され得る。例えば、本発明の細胞株は、診断の指標または免疫学的治療の標的として用いられ得る悪性の前立腺関連タンパク質の単離において有用である。本発明の一つの態様においてはタンパク質の生成の方法は本発明の上皮細胞株の培養の段階および新しい細胞によって生産された一つまたはそれ以上のタンパク質を採集する段階からなる。このよう

なタンパク質をコードする遺伝子の同定はそのタンパク質またはその一部の効率

的な大量生産のための組み替えベクターの構築を可能にする。

本発明の細胞株はまた、例えば化学治療用薬剤、生物学的応答修飾剤、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドのような治療用試薬の前立腺癌に対する効果の生体外での試験にも有用である。

本発明の細胞株はまた前立腺癌の再発を治療または予防するための全細胞ワクチンとしても有用である。全細胞ワクチンはそのままの状態でアジュバンドとともに投与されるかまたは、例えば様々なサイトカイン、ケモカイン、接着分子またはMHC分子をコードする外来遺伝子によって修飾されて投与され得る。

本発明の細胞株はまた、前立腺癌反応性の抗体または末梢血由来の免疫細胞またはリンパ節細胞を増大させるための刺激として前立腺癌患者に対して投与するために治療上有用である。

本発明はまた、免疫系によって認識される前立腺関連抗原の分子クローニングに用いる不死の前立腺細胞株を提供する。これらの抗原はさらに前立腺癌の予防または治療のための組み替えワクチンへと発展される。

本発明はさらに本発明の細胞株の一つまたはそれ以上からなる薬剤組成物、および薬理学的、治療的、および診断的不死細胞株の利用、および不死細胞株からなる薬理学的組成物を提供する。

本発明のこれらおよびその他の目的は付属の明細書および添付の図表によって明らかになる。

図面の簡単な説明

図1Aおよび1B。死化した前立腺上皮細胞株の形態および増殖に関する特性。(1A)は前立腺癌標本より生成された培養細胞1510-CPの永続的な増殖を達成するためにレトロウィルスLXSN16E6E7による不死化が必要であった。細胞は継代3において形質導入するか(1510-CPTX)、または形質導入せず(1510-CPNV)、そして継代5及び10のそれぞれの時期に24穴プレート中での増殖を観察した。(1B)は10培養継代後の1510-CPTXの顕微鏡写真(200倍、位相差顕微鏡)。この培養像は良性または悪性の標本から生成されたその他の前立腺上皮細胞株に典型的なものである。

図2。良性および悪性の前立腺細胞による組織内でのPSAの発現。患者1510からの前立腺全摘による正常な前立腺上皮(二重矢印)とともに浸潤した前立腺癌(矢印)の領域を含むパラフィン封埋組織切片。黒い色素は抗-PSAモノクローナル抗体の結合を示している。正常な前立腺上皮細胞によるPSAの発現は強く一様であるのに対し、癌細胞による発現は弱く、一様でない。間にあるストロマ細胞はPSAを発現していない。(200倍)。

図3。ヘテロ接合性の消失解析に用いられたマイクロサテライト指標の相対的な位置を同定した染色体8pの遺伝学的地図。

図4。患者1542より得られた新鮮な細胞および培養された細胞上のマイクロサテライトD8S136のPCR解析。レーン1、1542-NPTX、継代26。レーン2、微小切除された新鮮な腫瘍#11。レーン3、クローン化されていない1542-CP₃TX、継代21。レーン4-6、1542-CP₃TXの8継代目に由来する腫瘍クローン1542-CP₃TX.8.1、1542-CP₃TX.8.3および1542-CP₃TX.8.4。

図5A-5F。IFN- γ は1542-CP₃TXの表面にMHCクラスIおよびII分子の増強された発現を誘導する。未処理の1542-CP₃TX細胞は中程度の量のクラスI分子を発現している(モノクローナル抗体W6/32による染色)(5A)が検出できる量のクラスII分子は発現していない(モノクローナル抗体L243)(5B)。IFN- γ 500U/mlに3日間さらされた後ではクラスIの発現は増大し(5C)、クラスIIの発現は誘導されている(5D)。自家のEBV-形質転換B細胞によるMHCの発現が比較のために示されている(5Eおよび5F)。

発明の詳細な説明

本発明は正常な前立腺および前立腺癌細胞株を含む数多くの新鮮な外科的標本に由来するヒト成人前立腺上皮細胞株およびそのクローンの単離、不死化、および解析および、それらの研究及び治療に対する潜在的な応用を提供する。

本発明は一般的に不死細胞株および細胞株のクローンおよびここに述べた細胞株の一つまたはそれ以上からなる薬剤組成物、およびそれらの薬剤活性試薬としての使用を提供する。

特に、本発明は不死化した悪性の成人前立腺上皮細胞株を提供するおよび適合

する自家不死化した悪性および正常な前立腺上皮細胞株を提供する。不死化した前立腺上皮細胞株は本明細書において1510-CP(前立腺腫瘍)、1512-NP(正常前立腺)、1512-CP、1519-CP、1532-NP(1532-NPTXと記してある1532-NPは1996年2月2日に12301 Parklawn Drive, Rockville, MarylandのAmerican Type Culture Collection(ATCC)に登録番号RL-12036として寄託された。)、1532-CP₁、1532CP₂(1532-CP₂TXと記してある1532-CP₂は1996年2月2日にRockville, MarylandのATCCに登録番号CRL-12038として寄託された。)、1535-NP(1535-NPTXと記してある1535-NPは1996年2月2日にRockville, MarylandのATCCに登録番号CRL-12039として寄託された。)、1535-SV(貯精嚢, seminal vesicle)、1535-CP₁(1535-CP₁TXと記してある1535-CP₁は1996年2月2日にRockville, MarylandのATCCに登録番号CRL-12041として寄託された。)、1535-CP₂、1542-NP(1542-NPTXと記してある1542-NPは1996年2月2日にRockville, MarylandのATCCに登録番号CRL-12040として寄託された。)、1542-SV、1542-CP₁、1542-CP₂、および1542-CP₃(1542-CP₃Xと記してある1542-CP₃は1996年2月2日に12301 Parklawn Drive, Rockville, MarylandのATCCに登録番号CRL-12037として寄託された)。

本発明はまたクローン化された不死化した悪性の前立腺上皮細胞株をも提供する。さらに本発明はまた少なくとも1つの対立遺伝子ヘテロ接合性の消失(LOH)を持つものとして特徴づけられたクローンをも提供する。

一つの態様においてはクローン化された不死化した悪性のヒト成人前立腺上皮細胞株は少なくとも1つの対立遺伝子のヘテロ接合性の消失を持つものとして特徴づけられている。ヘテロ接合性の消失は染色体1、8、10および16といった染色体のうちの一つまたはそれ以上の上で起こり得る。一つの態様においてはクローン化された不死の悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株は染色体8pの上の一つまたはそれ以上の遺伝子座にヘテロ接合性の消失をもつものとして特徴づけられている。さらなる態様においてはクローン化された不死の悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株は染色体8pの上の遺伝子座12から21の一つまたはそれ以上の対立遺伝子のヘテロ接合性の消失をもっている。

ある態様においてはクローン化された不死の悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株は

D8S133、D8S136およびD8S131の上部の対立遺伝子の消失をもつものとして特徴づけられる。クローン化された不死化した細胞株はATCC CRL-12265として1997年1月15日にブダペスト条約の規定に基づいてRockville, MarylandのAmerican Type Culture Collectionに供与されたクローン化された不死の悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株である1542-CP3TX.8.1と同定される特徴を持っている。

もう一つのある態様においてはクローン化された不死の悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株はD8S133、D8S136およびD8S131の上位の対立遺伝子の消失をもつものとして特徴づけられている。クローン化された不死化した細胞株はATCC CRL-12264として1997年1月15日にブダペスト条約の規定に基づいてRockville, MarylandのAmerican Type Culture Collectionに供与されたクローン化された不死の悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株である1542-CP3TX.8.4と同定される特徴を持っている。

もう一つのある態様においてはクローン化された不死の悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株はSFTP-2、D8S136およびC8S131の下位の対立遺伝子およびC8S133およびNEFLの上位の対立遺伝子の消失をもつものとして特徴づけられている。クローン化された細胞株はATCC CRL-12263として1997年1月15日にブダペスト条約の規定に基づいてRockville, MarylandのAmerican Type Culture Collectionに供与されたクローン化された不死の悪性ヒト成人前立腺上皮細胞株である1535-CP1TX.14.3と同定される特徴を有する。

本発明の細胞系およびクローン細胞はヒトパピローマウイルス(HPV)遺伝子またはその一部を用い、不死化される。ある具体例として、悪性細胞は組換えレトロウイルスのE6およびE7をコードするHPVの部分を用い不死化される。本発明の不死化した悪性前立腺上皮細胞の培養細胞は、1年以上にわたり安定で生存可能のままである。

本発明はヒト成人前立腺上皮細胞の純粋な細胞系の単離およびクローン化の方法を提供するものである。特に、この方法は細胞培養から非上皮細胞、特に線維芽細胞を除去するのに効果的である。この方法は一次腫瘍を、形態的に正常な前立腺および悪性の前立腺に類似の細胞または組織へ精密に切開することを必要とする。線維芽細胞の成長を阻害するために牛胎児血清および／またはコレラトキ

シンをほとんど含まない、またはまったく含まない培地で培養される。分別トリプシン処理も培養中の前立腺上皮細胞から線維芽細胞を除去するために用いられる。その結果、上皮細胞系は90%以上、好ましくは100%純粋である。引き続き行う細胞系のクローン化の結果、細胞は100%純粋な上皮細胞となる。

本発明のもう一つの面は不死化した悪性前立腺上皮細胞の選択の方法である。以前の当該技術分野においては、悪性前立腺上皮細胞を正常な前立腺上皮細胞から区別する方法として、PSA発現、PAP発現、アンドロゲンによるPSA系の正の制御 (up-regulation)、ヌードマウスにおける悪性腫瘍の増殖、および異数体の核型などのマーカーを用いてきた。しかし、これらのマーカーでは、悪性の前立腺上皮細胞を正常細胞から確実に区別することはできない。ヘテロ接合体の喪失を指標とする、本発明の不死化した悪性の前立腺上皮細胞の選択の方法は、恒常的で再現性のある選択の方法を提供する。この方法は特定の染色体上の対立遺伝子座の特異的な欠失を同定する、少なくとも一つのDNAマーカーを利用する。この方法の態様として、DNAマーカーは8番染色体上の対立遺伝子座の特異的な欠失を同定する。この方法は、特定の染色体上の一つ以上の対立遺伝子座の欠失、または複数の染色体上の対立遺伝子座欠失を同定するために多くのDNAマーカーを用いるだろう。

悪性細胞を検出および同定する方法において、特定の染色体上の遺伝子座に特異的なPCRプライマーを、不死化した前立腺上皮細胞系から単離したDNAと保温し、PCR検定を行う。既知の正常細胞から得たDNAコントロールとの比較により、増幅産物を一つまたはより多くの遺伝子座位についてLOHを解析する。LOHの基準は、正常なDNAコントロールとの比較で、最低75%の対立遺伝子座欠失が悪性細胞で放射線写真により検出されることである。当該技術分野において通常の知識を有するものに知られる他の方法は、差異を検出するためのデンシトメーター解析を含み、LOHの基準は悪性細胞で最低30%の対立遺伝子座欠失が検出されることである。

本発明の不死化した悪性前立腺上皮の細胞系およびクローンは、正常な前立腺細胞では見いだされないまたは活性でない、悪性前立腺上皮細胞に特異的または過剰発現している新規遺伝子の同定にも役立つ。この新規遺伝子には癌誘導遺伝

子、増殖因子遺伝子、癌遺伝子、癌抑制遺伝子が含まれるが、これに限らない。これらの遺伝子は当該技術分野において通常の知識を有するものに知られる、標準差し引きハイブリッド形成、差異表示法、または標本差異解析(RDA) (51,52)などのRNA差し引き解析の方法を用いて同定される。新規遺伝子は当該技術分野において通常の知識を有するものに知られる標準的分子生物学の技術を用いてクローニングされる。前立腺ガンの発達に関与する新規遺伝子の同定は、前立腺ガンの阻害または抑制に役立つ反コード鎖オリゴヌクレオチドの開発(42)または組換えDNAワクチンの開発を可能とするだろう。

本発明の細胞系は上皮細胞癌遺伝子学のモデルとして役立つ。例えば、本発明の前立腺上皮細胞系は、とくに前立腺ガンの腫瘍化を理解する上で役立つ。本発明は良性から悪性へと細胞の表現型が変わるときの遺伝学的出来事を規定する指示薬として、同じ患者由来の悪性前立腺細胞系との組み合わせに用いるため、および前立腺ガンの遺伝形質の役割の調査のための良性の前立腺細胞系を提供する。

本発明の細胞系は前選択タンパク質またはその一部の生産方法や悪性前立腺上皮細胞起源タンパク質の生産の方法に利用することが可能である。例えば、本発明の細胞系は診断のためのマーカーまたは免疫治療の標的として働く前立腺ガン関連タンパク質の単離に役立つ。発明の具象において、タンパク質の生産方法は、本発明の上皮細胞系の培養の工程、および新規細胞により産生される一つまたはそれ以上のタンパク質の回収の工程を含むように規定される。そのようなタンパク質をコードする遺伝子の同定は、標準的科学校法を用い、組換えベクター、およびタンパク質またはその一部の効率的大容量生産のための宿主細胞の構築を可能とする。

本発明は、前立腺ガン関連タンパク質またはその一部を発現する新規組換えウィルスを含む。組換えウィルスは一つまたはそれ以上の共刺激分子、サイトカイン、MHC分子、ケモカイン、および前立腺ガン関連タンパク質またはその一部に対する免疫応答を増強する類似の分子を発現するだろう。組換えウィルスベクターによる外因性遺伝子産物の構築および発現は、当該技術分野において通常の知識を有するものに知られる方法でおこなう(43-50)。

本発明は不死化したヒト成人前立腺上皮細胞系またはクローン由来のDNAまたはRNAを含む。興味深いことは、不死化したヒト悪性成人前立腺上皮細胞から単離したDNAまたはRNAはLOHを示す。また、興味深いのは、調和した自家移植をした、不死化ヒト正常細胞、および悪性成人前立腺上皮細胞由来のDNAおよびRNAである。単離したDNA、およびRNAまたはそれらのオリゴヌクレオチドは前立腺ガンまたは個体の前癌の検出および診断に用いられるだろう。DNA、および器Aまたはオリゴヌクレオチドは、サザンブロット解析、ノザンブロット解析、PCR、RT-PCRおよび前立腺ガンまたは前癌の検出および診断に用いられる解析などの標準的分子生物学の技法で用いられるプローブ探査および／またはプライマーとして用いられる。興味深いことは、1、8、10および16番染色体などの一つまたはそれ以上の染色体上の対立遺伝子座の欠失を有するDNAと対応するRNAである。特に興味深いのは、8番染色体上の一つまたはそれ以上の対立遺伝子座の欠失を有するDNAと対応するRNAである。

前立腺ガン抗原またはその抗原基（エピトープ）をコードするむき出しのDNAは前立腺癌に対する活発な免疫治療のために用いられるだろう。当該技術分野において知られる技術を用いて、コードされる前立腺ガン抗原またはその抗原基に対する細胞性および体液性の両方の免疫反応を誘導するために、むき出しのDNAまたは脂質に結合させたむき出しのDNAを筋肉または皮膚へ注射することができる(33-41)。

本発明の細胞系は生体内または試験管内での前立腺癌に対する治療薬の効果の検定にも役立つ。例えば、化学治療薬、生体反応調節剤、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの遺伝的試薬について、この効果をスクリーニングできる。検定すべき化学試料または薬剤は生体内または試験管内で細胞存在下に置かれる。適当な期間の露出後、細胞に対する化学試料または薬剤の効果は、細胞毒素検定、タンパク質阻害検定、腫瘍増殖の阻害などの当該技術分野において知られる方法により検定される。生命維持に必要な代謝機能を阻害する、または細胞を殺す化学試料または薬剤は効果的な治療薬と考えられる。

本発明の細胞系およびクローンは、前立腺ガンの治療または再発を防ぐための全細胞ワクチンとしても役立つ。全細胞ワクチンは、そのまま、佐剤との組み

合わせで、又は例えばはさまざまなサイトカイン、ケモカイン、共刺激分子、接着分子、MHC分子などをコードする外因遺伝子（トランスジーン）により修飾した形で投与される。そのような修飾は、本発明の免疫原およびワクチンの免疫治療効果を高めるために用いられる。

遺伝子は、エレクトロポレーション、ポリブレン誘導DNA導入、プラスミドや組換えウィルスなどを介して、などでの当該技術分野において知られる方法により、不死化したヒト悪性前立腺上皮細胞系またはクローンへ組み込まれる。一つまたはそれ以上の目的の遺伝子を含む組換えウィルスはW094/16716、W096/11279およびW096/10419に記載されるように構築される。

本発明において用いることができる共刺激分子は、B7-1、B7-2、B7-3、ICAM-1、LFA-1、LFA-3、CD72などを含むがこれらには限らない。

本発明において利用できるサイトカインはIL-2、GM-CSF、TNF α 、IFN γ 、IL-12、IL-4、IL7などを含むがこれらには限らない。

MHC分子はクラスI、クラスII分子などを含むがこれに限らない。非標準MHC分子、またはCD1などのMHC類似分子もまた用いられるだろう。

ケモカインは、RANTES、IL-8、MIP1- α 、MIP- β などを含むがこれらには限らない。

本発明の細胞系は、前立腺ガン反応性抗体を生じる刺激剤、または末梢血またはリンパ節の細胞由来の免疫細胞の刺激剤として、前立腺ガン患者の処置のための治療上有益である。

本発明は免疫系に認識される前立腺ガン関連抗原の分子クローニングへの使用のための不死化した前立腺細胞系を提供する。クローニングされた抗原は前立腺癌の抑制または治療のための組換えワクチンへと開発される。

さらに本発明は、本発明の不死化細胞系からなる薬剤化合物、並びに不死化細胞系および不死化細胞系からなる薬剤組成物の薬理的、治療的、および診断的使用を提供する。

薬剤組成物、ワクチンおよび免疫原は薬理分野において通常の技術を有するものに知られる標準的技術に従い調製される。そのような組成物は、患者に対し患者に必要な投薬量を当該技術分野において通常の技術を有するものに知られる技

術で、患者ごとの年齢、体重、及び体調などの因子およびを考慮に入れ、適した投薬方法により投薬されることが可能である。

組成物、ワクチンおよび免疫原による免疫化の方法は、非経口的な方法（静脈注射、腹膜下注射、皮内注射、筋肉注射または皮下注射）であろう。組成物、ワクチン、および免疫原は腫瘍内へ直接投与してもよい。さらに、組成物は試験管内において抗原特異な細胞毒性Tリンパ球を刺激するために用い、そののちこのリンパ球を患者に戻すこともできる。

組成物、ワクチン、および免疫原は、ミョウバン、不完全フロイント佐剤、およびその類似物、サイトカイン、共刺激分子、ケモカイン、接着分子、HMC分子などの佐剤とともに共投与または連続投与されるだろう。さらに、組成物、ワクチン、および免疫原は、抗新生物薬、抗腫瘍薬、抗癌薬として、および/または抗新生物薬、抗腫瘍薬、抗癌薬の副作用を減少させるあるいは緩和させる薬剤とともに共投与または連続投与されるだろう。

ワクチンまたは本発明の組成物の例は、懸濁液、シロップ剤、エリキシル薬、および非経口として皮下注射、皮内注射、筋注射、または静脈注射などのための調製などの液体製剤を含む。薬剤組成物は、滅菌水、生理食塩水、グルコースなどの安定な担体、希釈液、または補形剤とともに混合されるだろう。

処置の効果は、悪性細胞または前立腺癌のペプチドまたはそれらの一部分を認識する抗体または免疫細胞の産生、抗原特異細胞毒性の評価、特異的サイトカインの産生、または腫瘍の後退により検定されることが可能である。

不死化したヒト成人前立腺上皮細胞またはその一部分はキットの型式で供給されるだろう。そのキットは一つまたはそれ以上の不死化ヒト成人前立腺上皮細胞またはその一部分を含むだろう。その一部分とは溶解した細胞、細胞断片、細胞間物質、細胞外成分、タンパク質、DNA、RNA、糖脂質などを含む。キットは自己由来のヒト成人悪性不死化前立腺上皮細胞またはその一部分を、自己由来のヒト成人正常不死化前立腺上皮細胞またはその一部分との組み合わせで含んでもよい。ある態様において、キットは不死化したヒト成人正常細胞系、1532-NPと自己由来不死化ヒト成人悪性細胞系、1532-CP₁ および/または1532-CP₂ の組み合わせからなる。別の態様においては、キットは不死化したヒト成人正常上皮細胞系、

1535-NPと自己由来不死化ヒト成人悪性細胞系、1535-CP₁、1535-CP₂および／または1535-CP₁TX.14.3.の組み合わせからなる。また、別の態様において、キットは不死化したヒト成人正常上皮細胞系、1542-NPと自己由来不死化ヒト成人悪性細胞系、1542-CP₁、1542-CP₂、1542-CP₃、1542-CP₃TX.8.1.および／または1542-CP₃TX.8.4.のうち一つまたはそれ以上との組み合わせからなる。キットは適当な担体、希釈液、補形剤を含む個別の容器を含んでもよい。キットは、佐剤、サイトカイン、共刺激分子、ケモカイン、接着分子、MHC分子、抗新生物剤、抗腫瘍剤、免疫検定試薬、PCR試薬、放射線標識なども含んでもよい。付加的に、キットは材料の混合または結合、および／または投与の教本を含むだろう。

ここで用いられた「不死化した」という用語は、細胞系が、ガラス器具ないにおいて最適な増殖培地で培養したとき、老化することなく連続的に増殖するということを意味する。

本発明はこの発明の細胞系に対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む。これらの抗体は本発明の方法で用いる抗体含有組成物の調製に用いられることが可能である。抗体は当該技術分野において通常の技術を有するものに知られる方法に従い調製される。特に、本発明の不死化した前立腺細胞系に対し産生されたモノクローナル抗体は、前立腺ガンの検出および治療への使用に有用である。抗体またはその抗原結合部位は悪性前立腺細胞に結合する。抗体またはその抗原結合部位は、少なくとも一つの前立腺腫瘍拒絶抗原、または少なくとも一つの前立腺ガン関連抗原およびその抗原基に対し免疫反応性を有する。

例示的抗体分子は、完全イムノグロブリン分子、実質的完全イムノグロブリン、またはF(ab)、F(ab)₂、およびF(v)を含む抗原結合部位を有するイムノグロブリン分子の部分である。ポリクローナルまたはモノクローナル抗体は当該技術分野において通常の技術を有するものに知られる方法に従い調製される (Kohler and Milstein, 1975 Nature 256:495-497; Campbellモノクローナル抗体技術、ゲッシー動物とヒトのハイブリドーマの製造と特徴Burdon et al(eds) (1985), 生化学および分子生物学における研究技術13巻、Elsevier Science Publishers, Amsterdam)。抗体またはその一部分は、Trautner et al The EMBO J.10(2):3655-3659, 1991およびMilenic, D.E. et al Cancer Research 51, 6363-6371, 1991およびヒ

ト型抗体に関しては米国特許第5,530,101に記載されるように、キメラ抗体、一本鎖抗体技術を含む遺伝工学的技術により製造されるだろう。

抗体またはその一部は免疫治療に用いられるだろう。抗体またはその一部は単独で、または当該技術分野において知られる化学治療剤または免疫抑制剤とともに投与されるだろう。

抗体またはその一部は特に悪性前立腺細胞を標的し、殺傷するための免疫毒素としても用いられるだろう。免疫毒素は2つの構成要素により特徴づけられ、試験管内、または生体内において選択的に細胞を殺傷するのに特に有用である。一つの構成成分は、細胞が接触または吸収されたとき、通常は細胞に致命的に作用する細胞毒性剤である。2つめの構成成分は、輸送媒体として知られ、毒性剤を悪性前立腺細胞など、特定の細胞型に対し輸送する手段を提供する。2つの構成成分は、さまざまなよく知られる化学的段階により互いに結合される。例えば細胞毒性剤がタンパク質のとき、抗体への連結はヘテロ二官能性架橋剤、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド、およびその類似体などによって行われるだろう。さまざまな免疫毒素の産生の手順は、当該技術分野においてよく知られている、例えば「モノクローナル抗体-毒素融合体：魔法の弾薬を目指して」、Thorpe et al, 臨床薬におけるモノクローナル抗体, Academic Press, pp.168-190(1982)の中に見られる。構成成分は、Chaudhary et al Nature 339, 394(1989)に概説されているようにして連結することもできる。

さまざまな細胞毒素は免疫毒素における使用に適している。細胞毒薬剤は、ヨウ素-131または他のヨウ素同位体、イットリウム-90、レニウム-188、ビスマス-212、または他の α 線放出体などの放射線核種や、ビンデシン、メトトレキサート、アドリアミシン、タキソール、およびシスプラチナムなどの多くの化学治療薬や、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シュードモナス外毒素A、リシン、ジフテリア毒、リシンA鎖およびこれらの類似物(Chimeric oxins, Olsnes and Phil I, Phannac. Ther. 25, 355-381(1982)のようなリボソーム阻害タンパク質、および Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, eds. Baldwin and Byers, pp.159-179, 224-266, Academic Press, 1985を参照)などの細胞毒タンパク質を含むが、これらに限らない。

診断の目的に対し、抗体は標識または非標識のどちらでも用いられるだろう。

非標識抗体は他の標識された抗体との組み合わせで用いられるだろう。放射線核種、蛍光、酵素、酵素基質、酵素共因子、酵素阻害剤、試薬、およびそのようなものなど多くの種類の標識が用いられる。多くの型の免疫検定が有用であり、当該技術分野において通常の技術を有するものにより知られる。

本発明中の細胞系、遺伝子、タンパク質、および抗体はさまざまな治療および診断に有用である。より特異的な例証を以下に記載する。

明記した参考文献は参照により本明細書に援用される。

実施例1

(1) 培養上皮細胞系列が生成された患者の性質

前立腺上皮細胞系列が、中ないし高度の段階 (Gleason段階6-8) の腫瘍を持つ点で一貫性のある6人の患者に由来する根治的前立腺切除の標本から生成された。(表1を参照のこと。)細胞の培養は、新鮮な根治的前立腺切除標本から切除された一次腫瘍結節の機械的な破壊または酵素的な消化によって生成された。培養方法の詳細な記述は実施例2を参照のこと。

表1：前立腺癌患者：臨床情報

患者番号	年齢(歳)	手術前PSA(ng/ml)	手術後Gleason 段階
1510	51	14.9	3+3=6
1512	64	14.0	4+3=7
1519	54	7.7	4+4=8
1532	52	5.0	3+3=6
1535	66	2.2	3+5=8
1542	48	14.3	3+5=8

(2) 組織標本の病理学的解析

前立腺癌細胞系列の生成に使用した新鮮な組織標本の病理学的解析によって、ある癌標本は純粋な腫瘍であり、別のものは良性および悪性細胞の混合物から成ることが明らかになった。標本の予備的同定は、技術を有する病理学者による肉眼による試験に委ねられた。表2を参照のこと。顕微鏡による同定は技術を有す

る病理学者による10ヶ所の高拡大視野の試験に委ねられた。BPH=良性前立腺肥大、PIN=前立腺上皮細胞間新生物。a=細胞型の混合物、b=80%の標本が良性の筋繊維間質からなる。c=ひとつの顕微鏡学的な癌の細胞増殖巣が認められた。

表2：新鮮な前立腺標本の病理学的解析

患者番号	肉眼による標本	顕微鏡学的解析 (推定% 総細胞数)			
		良性	BPH	PIN	腫瘍
1510	腫瘍	40 ^a	0	40 ^a	60
1512	正常前立腺	100	0	0	0
	腫瘍	90 ^a	90 ^a	0	10
1519	正常前立腺	100	0	0	0
	腫瘍	50	0	0	50
1532	正常前立腺	95	0	5	0
	腫瘍1	100	0	0	0
	腫瘍2	0	0	0	100
1535	正常前立腺	20 ^b	0	0	0
	精囊	100	0	0	0
	腫瘍1	0	0	0	100
	腫瘍2	5	0	10	85
1542	正常前立腺	0	95	5	- ^c
	精囊	100	0	0	0
	腫瘍1	0	0	40	60
	腫瘍2	0	0	40	60
	腫瘍3	0	0	40	60

(3) 前立腺由来細胞系列の上皮起源の確認

前立腺由来細胞系列の上皮起源はサイトケラチン染色により確認された。高分子量および低分子量サイトケラチンの両方が、6個の根治的前立腺切除標本(正常前立腺、前立腺癌、正常精囊)に由来する16の細胞系列すべてにおいて発現されていた。いずれの前立腺由来の細胞系列も(但し、1519-CPの早期継代は除く)P
SAまたはPAPを発現しなかった。表3を参照のこと:F=線維芽細胞、NP=正常前立腺、SV=精囊、CP=癌腫前立腺、a=高分子量および低分子量サイトケラチンの両方を

含む、b=PSAおよびPAPの発現が培養継代数5において記録されたが、試験管内(in vitro)での継代を続けた後に消えた。c=観察された染色はバックグラウンドである可能性があった。

表3：不死の前立腺上皮細胞系列の免疫細胞化学的解析

患者#	細胞原	% 陽性細胞 (染色強度)		
		PSA	PAP	サイトケラチン ^a
1510	F	0	0	25(1-2+) ^c
	CP	0	0	>75(4+)
1512	NP	0	0	>75(4+)
	CP	0	0	>75(4+)
1519	F	0	0	>75(1+) ^c
	CP	>75(2-3+) ^b	>75(4+) ^b	>75(4+)
1532	F	0	0	5(1-2+)
	NP	0	0	>75(4+)
	CP ₁	0	0	>75(4+)
	CP ₂	0	0	>75(4+)
1535	NP	0	0	>75(4+)
	SV	0	0	>75(4+)
	CP ₁	0	0	>75(4+)
	CP ₂	0	0	>75(4+)
1542	NP	0	0	>75(4+)
	SV	0	0	>75(4+)
	CP ₁	0	0	>75(4+)
	CP ₂	0	0	>75(4+)
	CP ₃	0	0	>75(4+)
LNCaP		>75(4+)	25(3-4+)	>75(4+)

(4) 細胞表面の表現型の確認

細胞表面の表現型の確認は実施例II表6に記載した。

(5) 前立腺上皮細胞系列の遺伝学的解析

第8染色体における対立遺伝子の欠失はPINおよび侵食性前立腺癌と関連してお

り、したがって、前立腺癌標本由来の上皮細胞系列の性質決定のための代替的方法を示唆している。PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)を用いた、染色体8p上の10個の分離した遺伝子座における対立遺伝子の欠失試験により、試験を行った9系統のクローン化されていない癌由来の細胞系列中の1系統において、1個の遺伝子座におけるヘテロ接合性の欠失 (LOH) が明らかになり、これが確立された長期の一次前立腺腫瘍細胞系列であることを示唆している。試験管内 (in vitro) での培養のためには、最も純粋な腫瘍断片を分離することに細心の注意を払ったが、引き続きいて、元の腫瘍標本を顕微鏡で評価したところでは、良性の上皮、BPH、PIN、および/または侵食性の腫瘍からなる変動性の混合物であり (表2を参照)、LOHが隠されているおそれがあったため、正確な性質決定のためには上皮細胞のクローン化を必要とした。本明細書に記載されている前立腺細胞系列の最終的な遺伝学的性質決定、および前述の系列の単一細胞のクローン化は以下に記載した。

実施例2

不死悪性前立腺上皮細胞の単一細胞のクローン化および性質決定

材料および方法

一次細胞培養の生成

細胞系列の産生に使用した組織標本は、中度から高度の局地的前立腺癌 (Gleason段階6-8、腫瘍段階T2CからT3C) の治療のためにNCIにおいて根治的前立腺切除を実行中の6人の連続的患者から得られた。手術室から直接得られた新鮮な切除前立腺は無菌条件下で熟練病理学者によって分離された。肉眼による検査において正常な前立腺、前立腺癌、または正常な精嚢と称される組織は、細胞培養を産生する目的で別個に分離された。培養は機械的な破壊 (直径<1cmの断片) または酵素的な消化 (>1cm断片) (21) によって生成された。1510番および1512番の患者から得られた標本は酵素的な消化により調製され、その後の培養は機械的な破壊によって生成された。酵素的消化のために、細分された組織は100mlの消化培地に懸濁し、攪拌板上に室温で一晩放置した。その結果生じた単一細胞の懸濁液を滅菌されたPBSによって洗浄し、増殖培地 (以下を参照) に再懸濁し、ラット尾部1型コラーゲン (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) で覆われた6穴ブ

レートに分配した。標本の機械的破壊のためには、組織断片を少量の増殖培地中で2-3mm四方の立方体に注意深く細分し、その結果生じた組織および細胞の懸濁液を6穴プレートに分配した。全ての培養は1穴あたり1mlの体積で生成され、37度、5%CO₂で保温された。生育中の細胞および組織を固定化し、およびプレートに接着させるために、それらを2-3日間静置した。次に、未接着の残留断片を注意深く吸い取り、穴を3-5mlの新鮮な培地で満たした。培養培地は規則的に2-4日毎に取り替え、増殖している着生細胞は次にトリプシンによる脱離処理を行った。確立した増殖培養物は組織培養フラスコ (Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ)の中で維持した。前立腺および精嚢上皮細胞系列のための増殖培地は、25 µg/mlウシ脳下垂体抽出物、5ng/ml上皮増殖因子、2mM L-グルタミン、10mM HEPES緩衝液、抗生物質、および5%熱不活化ウシ胎仔血清 (FBS) (Biofluids, Rockville, MD)を含む、ケラチノサイト血清欠乏培地(ケラチノサイト-SFM, GIBCO-BRL, Grand Island, NY)からなる。新鮮な組織標本からの上皮培養の生成のためには、FBSの濃度を1-2%に減少し、および/または夾雑的線維芽細胞の増殖から保護するために10-20ng/mlの濃度でコレラ毒素 (Sigma, St. Louis, MO)を添加した。まれに上皮細胞培養液に線維芽細胞が残存する場合は、純粋な上皮細胞

培養物を獲得するために、分別的トリプシン処理(37℃で1-2分保温し、次に、さらに着生した上皮細胞を残すために遊離の線維芽細胞を洗浄除去する)が非常に成功した。

自己由来の線維芽細胞系列は良性の前立腺間質組織の機械的な破壊から産生され、10%熱不活化FBSを含むRPMI 1640培地で培養された。自己由来のエプスタイン-バーウイルス感染B細胞系列は標準的な技術を用いて産生され、RPMI 1640+10%FBSにおいて培養された。

転移性前立腺癌細胞の培養

着生の細胞系列LNCaP、DU145、PC-3(ATCC, CRL1740, HTB81, CRL1435の各々)およびTSU-Pr1 (Johns Hopkins大学, Baltimore, 寛大にもMDのWilliam Issacs博士より提供された; Iizumi et al., J. Urol. 137:1304-1306, 1987に記載されている)を10%FBSを添加したRPMI 1640培地において維持した。

一次細胞培養の不死化

細胞培養の不死化は、活性的に増殖している細胞を、ヒト乳頭腫ウイルス血清型16(HPV16)のE6およびE7形質転換タンパク質および真核生物選択マーカーであるネオマイシンリン酸転移酵素をコードするLXSN16E6E7と称されるレトロウイルス(寛大にもDenise Galloway博士, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WAより提供された)(22)によって形質導入することにより達成された。不死化の調製において、短期上皮細胞培養(培養継代1-3)を1:2に分け、少なくとも48時間、6穴プレートにおいて再接着させ、50-60%の集密状態の培養を得た。LXSN16E6E7組換えウイルスによる形質導入は、培養培地を、 $10\mu\text{g/ml}$ DEAE-デキストラン(Sigma)の存在下で24時間の間レトロウイルス産生系列PA317(22)から収集した培養上清に置き換えることにより達成された。

不死化された細胞培養の単一細胞のクローン化

不死上皮細胞培養のクローン集団はLOH性質の研究のために産生された。簡潔に述べると、集密的な細胞培養をトリプシンにより採取し、洗浄および計数をおこなった。細胞は、ケラチノサイト増殖培地(上を参照)において2-5細胞/ ml の濃度に連続的に希釈し、96穴・平底微小培養プレートの穴8-10個に $200\mu\text{l}$ /穴(≤ 1 細胞穴)ずつ分配した。DNA抽出および低温保存のための十分な細胞を確保するために、 <1 細胞/穴の希釈に起源をもつ集密細胞を24穴プレートに展開した。

免疫細胞化学的解析

不死化された培養細胞の免疫細胞化学的研究のために、細胞をトリプシンで採取し、洗浄し、ペレットにした。細胞のペレットは次に10%緩衝化ホルマリンで固定し、パラフィンで包囲した。前立腺標本由来の新鮮な組織断片もまたホルマリンで固定し、パラフィンで包囲した。新鮮な腫瘍標本および培養した細胞塊から5ミクロンの切片を調製し、帯電したスライドの上に乗せた(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)(23)。アビジン-ビオチン・ペルオキシダーゼ複合法および以下の一次抗体を用いて免疫細胞化学を行った：抗ヒト前立腺特異的抗原(PSA)モノクローナル抗体(Dako Corp, Carpinteria, CA)；抗ヒト前立腺アシッドホスファターゼ(PAP)ポリクローナル抗体(Dako Corp, Carpinteria, CA)；抗ヒトサイ

トケラチンCAM5.2 (Becton-Dickinson, San Jose, CA) ;および抗ヒトサイトケラチンAE1/AE3 (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN)。細胞系列および腫瘍組織断片は細胞の染色の割合 (<25%, 25-50%, 50-75%または>75%) および染色強度 (1+から4+まで) をもとに評価した。

フローサイトメトリー

将来的な研究およびさらなる性質決定のために、長期前立腺上皮細胞系列における免疫学的に重要な表面分子の発現量を決定することは興味深いことであった。不死化された細胞培養を採取し、以下のモノクローナル抗体による染色をおこなった: CD54 (抗ICAM-1), CD80 (抗7.1), CD86 (抗7.2) (Becton-Dickinson), W6/32 (抗HLA-A,B,C) およびL243 (抗HLA-DR) (ATCC, Rockville, MD) (21)。MHC分子の表面での発現を増強させるために、フローサイトメトリー解析の前に細胞をIFN- γ 500 U/mlの存在下で72時間培養した。

顕微解剖およびDNA抽出

ホルマリンで固定しパラフィンで包囲した組織試料由来の正常な前立腺上皮細胞または侵食性腫瘍細胞の、選択した細胞増殖巣の顕微解剖は既に記載したとおり直射光顕微鏡可視化のもとで行われた(24,25,26)。簡潔に述べると、未染色のホルマリン固定およびパラフィン包囲した5ミクロンの組織学的組織断片をスライドグラス上に調製し、およびキシレンによって2回脱パラフィン化し、95%エタノールで2回洗浄し、エオシンで染色して風乾した。隣接した断片はヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。興味のある特異的細胞をエオシン染色したスライドグラスから選択し、改良を加えた使い捨ての30ゲージの針で顕微解剖した。DNAは顕微解剖により得られた $1-5 \times 10^3$ 個の細胞から抽出した。場合によっては、癌または正常な上皮の分離した隣接する一つ以上の細管に由来する細胞を組み合わせた。DNAはまた活性的に増殖している不死化された培養から得られた $1-5 \times 10^4$ 個の細胞からも抽出した。細胞は即座に、0.01M TRIS-HCl pH8.0, 1mM EDTA, 1% Tween 20, および0.1mg/mlプロテイナーゼKを含む溶液(顕微解剖した細胞に対しては20 μ l, または培養細胞に対しては200 μ l)に再懸濁し、37℃で一晩インキュベートした。インキュベーションに続いて、プロテイナーゼKを不活化するため

にその混合物を5-10分煮沸し、次のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)解析のために4℃で保存した。

ヘテロ接合性の欠失の検出

染色体8p12-21におけるLOHの検出のために使用した多DNAマーカーにはSFTP-2, D8S133, D8S136, NEFL, D8S137, D8S131, D8S339, およびANKを含めた。DNAミクロサテライトマーカーを増幅するために使用したPCRプライマーの組は以下の通りである：

1)SFTP2

核酸配列：6861

プライマー：プライマー名 プライマー配列

SFTP2CA CAGCCCAGACAGGCTGGAA (Seq. ID No.1)

SFTP2CT ACTTTTCTGGCCAAACTCCTG (Seq. ID No.2)

増幅配列最小長：0.111

増幅配列最大長：0.157

Wood, S Genomics 24:597-600, 1994に記載されている。SFTP2は8p11-8p22の間の領域に位置する。

2)D8S133

核酸配列：M73471

プライマー：プライマー名 プライマー配列

D8S133CA CAGGTGGGAAAAGTGAAGGA (Seq. ID No.3)

D8S133GT AGCAACTGTCAACATATTGCTC (Seq. ID No.4)

増幅配列最小長：0.094

増幅配列最大長：0.112

Wood, S Cytogenet Cell Genet 58:1932, 1991; Wood, S Genomics 13:232, 1992に記載されている。

3)D8S136

プライマー：プライマー名 プライマー配列

D8S136CA GCCCAAAGAGGAGAATAAA (Seq. ID No.5)

D8S136GT CTGTTTCCACACCGAAGC (Seq. ID No.6)

増幅配列最小長：0.071

増幅配列最大長：0.089

Wood, S Cytogenet CellGenet 58:1932, 1991に記載されている。

4)NEFL

核酸配列：L04147

プライマー：プライマー名 プライマー配列

214 GCAGTAGTGCCGAGTTTCA (Seq. ID No.7)

215 TGCAATTCATCTTCCTTTCT (Seq. ID No.8)

増幅配列最小長：0.137

増幅配列最大長：0.147

Rogaev, E. Hum. Mol. Genet. 1:781, 1992に記載されている。

5)D8S137

核酸配列：X61694

プライマー：プライマー名 プライマー配列

D8S137CA AAATACCGAGACTCACACTATA (Seq. ID No.9)

D8S137GT GCTAATCAGGAATCACCCAA (Seq. ID No.10)

増幅配列最小長：0.152

増幅配列最大長：0.161

Wood, S Cytogenet CellGenet 58:1932, 1991; Wood, S Nucleic AcidRes. 19:66

64, 1991に記載されている。

6)D8S131

プライマー：プライマー名 プライマー配列

131CA2-1 ACATAGGCTGGAGAGTCACAGG (Seq. ID No.11)

131CA2-2 GGATGAGGCTCAGCACACAAGC (Seq. ID No.12)

増幅配列最小長：0.132

増幅配列最大長：0.144

引用に記載されている：Yu, CE Hum. Mol. Genet. 3:211, 1994。

7) D8S339

プライマー：プライマー名 プライマー配列

WT251-A TAGATGTTACCATTTTCAC (Seq. ID No.13)

WT251-B GATTAGATCTTGGATCAG (Seq. ID No.14)

増幅配列最小長：0.162

増幅配列最大長：0.176

引用に記載されている：Thomas, W. Hum. Mol. Genet. 2:828, 1993。

8) Ank

核酸配列：D16990

プライマー：プライマー名 プライマー配列

ANK1.PCR1.1 TCCCAGATCGCTCTACATGA (Seq. ID No.15)

ANK1.PCR1.2 CACAGCTTCAGAAGTCACAG (Seq. ID No.16)

Polymeropoulos et al. Nucleic Acid Res 19:969, 1991に記載されている。

PCRは既に記載されたように行われた(19)。簡潔に述べれば、12.5 μ l PCR反応混合物は、200 μ M dATP、dGTPおよびdTTP；40 μ M dCTP；0.8mMプライマー (Research Genetics, Huntsville, Ala.)、またはApplied Biosystems DNA合成機において合成された)；2 μ Ci [α^{32} P] dCTP；16 μ M塩化テトラメチルアンモニウム(27)；1X PCR反応緩衝液(1.25mM MgCl₂を含む)および1ユニットのTaqポリメラーゼ(Boehringer Mannheim)を含めた。マーカーD8S133およびD8S137においては生成物の増幅および精度を改善するために5%DMSOを加えた。すべてのマーカーについて反応は以下のように行われた：95℃2分、次に28から40サイクル(マーカーに依存する)のアニーリングおよび伸長反応(95℃30秒、アニーリング温度で30秒、および72℃30秒) および72℃で2分間の保温と続けた。各々のマーカーに対するアニーリング温度は、プライマーの長さおよび組成に基づく最初の推算から経験的に決定した。

標識された増幅DNA試料を90℃で5-10分変性し、7%アクリルアミド(30:0.8アクリルアミド：ビスアクリルアミド)、5.6M尿素、32%ホルムアミドおよび1X TBE(0.089M Tris pH8.3、0.089Mホウ酸、0.002M EDTA)からなるゲルにのせた(28)。試

料は95で2-4時間電気泳動した。ゲルは配列決定用ゲルろ紙(Bio-Rad)に転写し、Kodak X-OMATフィルムによって放射線写真を行った。LOHの基準は、一つのアリルにおいて、自己由来の新鮮なPBL対照と比較して少なくとも75%の欠失として、3人の独立な検査員による直接可視化によって決定された。十分な量のDNAが使用可能な場合は、LOHは少なくとも2種類の独立した実験によって証明した。

結果

細胞培養のための組織獲得

一次(非転移性)標本由来の不死前立腺腫瘍細胞系列の生産には従来困難が伴うことが知られていたため、先ず最も大きな粗悪な外見の癌小結節(1から3cm)が、培養細胞を生産するための新鮮な組織原として選択された。次に最初の3試験(患者1510、1512、1519)由来の隣接する組織分画の顕微鏡観察から、「癌」標本には良性前立腺上皮、良性前立腺肥大(BPH)、前立腺上皮内腫瘍形成(PIN)および浸潤性癌細胞の様々な混合物が含まれることが判明した。しかし、患者1512および1519由来の「正常」標本は良性の前立腺上皮のみから構成されていた(表2)。

後の患者から癌細胞系列を生成するための純粋癌細胞を得る可能性を上昇させるために、小組織断片(<1cm)が組織培養、凍結およびパラフィン切片用の隣接切片とともに獲得された。さらに、可能な場合には、複数の別々の癌組織断片が培養細胞作製のために個々の標本から選択された。これらのより緊縮な条件を用いることにより、3つの根本的前立腺除去手術標本(患者1532、1535、1542)について7回中6回の試験で少なくとも95%の腫瘍形成細胞(PINと侵入腫瘍)を含む組織切片を獲得することが可能であった。さらに、3つの良性前立腺上皮細胞系列および2つの良性精嚢上皮細胞系列の生成に適した組織断片が、これらの根本的前立腺除去手術標本から解剖摘出することに成功した(表2)。

前立腺由来細胞系列の不死化および免疫細胞化学的分析

表2に示された17組織標本(患者1519由来正常前立腺)のうち1つを除いて全てが短期間培養で容易に確立された。しかし、細胞増殖は比較的遅く、5-6週間以上の生存能力のある活発に成長する培養細胞を確立するためには、試験管内で

の上皮培養細胞の不死化が必要であった。粘着性単層培養細胞が、HPV16のE6およびE7形質転換タンパク質をコードする組換えレトロウイルスで2または3継代に渡って形質転換され、その結果16個の長期上皮細胞系列が生じた。そのうち4個は正常前立腺由来、2個は精嚢由来、10個は一次癌標本由来である。さらに、4患者の前立腺ストロマから生成した不死繊維芽細胞系列が確立された。形質転

換の成功は、1mg/ml濃度のG418中での細胞生存率、および同時に観察された非不死化培養細胞に比べて、50培養継代以上の細胞生存率の増加と増殖の速さにより確認された(図1A)。顕微鏡下で、全ての不死化前立腺上皮細胞系列は良性組織由来か悪性組織由来かによらず同じ形態を示した。即ち、培養細胞の形態は良性細胞を悪性細胞から区別するための指標にはならない(図1B)。

前立腺由来の細胞系列の上皮および前立腺起源を確認するために、免疫細胞化学分析が活発に増殖する不死培養由来の細胞塊に対して行われた(表3)。正常前立腺由来、正常精嚢由来および前立腺腫瘍標本由来のものを含む、当研究室で生成した全ての上皮細胞系列により、高および低分子量サイトケラチンが発現された。75%以上の細胞が、確立された転移性前立腺腫瘍細胞系列LNCaP、DU145、PC-3およびTSU-Pr1で観察された染色と同程度の強度4+で染色された。即ち、これらの培養の上皮起源が確証された。対照の繊維芽細胞系列または黒色腫細胞ではいかなる有意なサイトケラチン発現も観察されなかった。

サイトケラチン発現陽性によって、一次前立腺腫瘍標本から生成した細胞系列が事実上皮起源であることが示されたが、これらの培養細胞による前立腺関連タンパク質PSAおよびPAPの発現を検査することも同様に重要であった。患者1519から生成した不死前立腺腫瘍由来細胞系列(1519-CPTX)のみが、5培養継代後もこれらのタンパク質を検出可能なレベルで発現した(各々、>75%の強度2-3+の細胞染色、および>75%の強度4+の細胞染色)。しかし30培養継代後では、PSAおよびPAPの発現は1519-CPTXにおいてもは検出されなかった。さらに、この細胞系列の継代の後期では、発現はIFN- γ -2'-デオキシシチジンまたはジヒドロキシテストステロンにより誘導されなかった。PSAおよびPAPの発現のための固定された前立腺腫瘍組織切片の免疫組織化学的検定からは、しばしば癌化の弱い

不均質の染色と、これらのタンパク質のいかなる検出可能な発現も示さないいくつかの癌フォーカスが見られた。反対に、同じ顕微鏡下の分画でのすべての正常な腺はPSAおよびPAPについて強く均一に染色された（図2）。前立腺腫瘍細胞による生体内（in situ）でのPSAおよびPAPの弱い不均質な発現は、不死化前立腺癌由来細胞系列で発現が見られないことを説明し得る。しかし、良性前立腺上皮細胞系列で発現がないことは相当する組織分画で観察される強い発現と相関せず

、PSAおよびPAPの発現の欠損は試験管内での細胞培養の結果としても生じ得るということが示唆される。

顕微解剖された組織でのLOHについての染色体8pの検定

上述したように、本発明の「前立腺腫瘍」細胞系列は多くの場合、良性および悪性の細胞型の混合物を含む組織試料に事実上由来する（図2）。全ての培養細胞は長期増殖を誘導するためにレトロウイルスでの形質転換を必要とし、また良性および悪性の形質転換された前立腺上皮細胞は形態的にも組織化学的にも区別が不可能であるため、新規に生成した培養細胞の特性決定のための代替法としてLOH分析の使用が開発された。まず対応する新鮮な組織切片から顕微解剖された癌フォーカスまたは正常上皮細胞において、染色体8p12-21上のLOHが検査された。顕微解剖された前立腺腫瘍標本における高割合のLOHを検出することが示されている（19）、8つのマイクロサテライトマーカーのついたパネルが染色体8p欠失を同定するために選択された。8つのマイクロサテライトマーカーのパネルは、図3に示すように、染色体8の遺伝子座11から21の欠失を同定することができる。顕微鏡下で正常な外見をもつ細胞が悪性形質転換の前駆体としてLOHを含むと仮定することにより、低温保存された新鮮な、自己由来のPBLがLOH分析のための正常の対照として用いられた。6患者全てが、新鮮なPBL由来のDNAの分析により、検査された4または8つ以上の遺伝子座でヘテロ接合している（情報を与える）ことが示された。しかし、2患者（1519および1532）については、顕微解剖された癌標本はLOHの証拠を示さず、LOH分析はこれらの標本に由来する培養細胞の特性決定に有用であり得ないことが示唆された（表4）。

表4 前立腺腫瘍または良性上皮の顕微解剖病巣における染色体8p上のLOH

患者 検査された		染色体8p上の位置							
番号	病巣数	SFTP-2	D8S133	D8S136	NEFL	D8S137	D8S131	D8S339	ANK
1510									
癌	2	●	●	●	—	●	—	●	●
正常	3	●	●	●	—	●	—	●	●
1512									
癌	1	—	●	●	●	nd	—	●	nd
正常	1	—	○	○	○	nd	—	○	nd
1519									
癌	1	—	○	○	○	—	○	○	○
正常	1	—	○	○	○	—	○	○	○
1532									
癌	8	—	○	○	○	nd	—	○	nd
正常	1	—	○	○	○	nd	—	○	nd
1535									
癌	6	●	●	●	●	—	●	○	—
正常	1	○	○	○	○	—	○	○	—

異型接合性の保持 (○)

異型接合性の欠失 (●)

非情報的 (同型接合性対立遺伝子) (—)

非決定 (nd)

反対に、患者1510および1512からの顕微解剖された腫瘍は検査された全ての情報座位においてLOHを示した。患者1535については、6つの別々の顕微解剖された癌フォーカスが検査され、全てがLOHの同様のパターンを示した。興味深いことに、患者1542からの顕微解剖された異なる12の癌のLOH分析からはLOHについて異

なるパターンが示され、12中4つは検査された16全ての情報対立遺伝子の保持を

示した(表5)。顕微解剖された正常上皮は、患者1510由来の標本を例外として、染色体8p上のLOHの証拠を示さなかった。患者1510由来の顕微解剖された「正常な」3つのフォーカスはすべて、自己由来の癌で観察されたLOHのパターンと一致した大きなLOHを示し、この種の研究のための正常対照としてPBLを使用することの重要性が強調される。

表5 患者1542由来の顕微解剖された前立腺組織および不死化細胞系列における染色体8p上のLOH

細胞原		染色体8p座位			
		D8S133	D8S136	D8S137	D8S131
<u>顕微解剖されたフォーカス</u>					
正常上皮		NL	NL	NL	NL
癌	1	LL	LL	LL	LL
	2	nd	nd	NL	NL
	3	LL	LL	LL	LL
	4	NL	NL	NL	NL
	5	LL	LL	NL	NL
	6	NL	NL	NL	NL
	7	LU	LU	LU	LU
	8	NL	NL	NL	NL
	9	LU	nd	NL	NL
	10	LL	LL	NL	NL
	11	LU	LL	NL	NL
	12	NL	LL	LL	NL

<u>培養細胞系列</u>					
NPTX	(p20) ^a	NL	NL	NL	NL
CP ₃ TX	(p3, 6, 13)	NL	NL	NL	NL
CP ₃ TX clone 1 ^d	(p8)	LL	LL	nd	LL
clone 3 ^b	(p8)	nd	NL	nd	NL
clone 4 ^c	(p8)	LU	LU	nd	LU
CP ₃ TX	(p21)	LU	LU	LU	LU
CP ₃ TX clone ^e	(p23)	LU	LU	LU	LU

LOHなし (NL)

上部対立遺伝子の欠失 (LU)

下部対立遺伝子の欠失 (LL)

非決定 (nd)

a 連続的培養継代番号

b 7つの個々のクローンの代表

c 30個の個々のクローンの代表

d クローン1542-CP₃TX.8.1

e クローン1542-CP₃TX.8.4

患者1542由来の不死化細胞系列のLOH分析

患者1542から生産された細胞培養の異型接合性の欠損は、12の異なる顕微解剖された癌フォーカスにおいて表れたLOHの様々なパターンにてらして特に興味深い。この患者はD8S133、D8S136、D8S137、D8S131、D8S339およびANKについて情報を示している。これらの座位のうち4つにおいて、癌、正常前立腺、正常精嚢、および正常繊維芽細胞由来の培養細胞における対立遺伝子の欠失に関して詳細に検査した(表5)。1542-CP₃TXとして示す癌由来の初期継代の大量培養(継代3、6、13)を反復的に分析することからは、検査された4つのマイクロサテライトマーカーのいずれについてもLOHが見られなかった。しかし、21連続培養継代

(約6カ月)後、1542-CP₃TXは検査された4つの位置全てにおいて上部対立遺伝子の欠失を示した。この欠失パターンは、顕微解剖された癌位置7番に見られる

パターンと同じであった。30の単一細胞クローンが1542-CP₃TXの継代23より生成され、全てが非クローン化後期継代培養および顕微解剖された癌7番と同じLOHパターンを示し、大量後期継代細胞系列のクローンの、またはクローンに近い組成を示した。これらの知見はまた1542-CP₃TXの初期継代におけるLOHの検出の失敗は、大量培養における異なるパターンを持つ複数の癌クローンの存在を示唆し、PCRに基づく方法でのLOHの検出が阻害されたと思われる。このことを調べるため、1542-CP₃TXの初期継代（継代8）から単細胞クローンが生成され、LOHを検査された（図4）。9クローンのうち7つは、患者1542由来の顕微解剖された癌のうちの12個中3個と同様、D8S136またはD8S131においてLOHを示さなかった。しかし、1つのクローン（クローン4）（1542-CP₃TX.8.4）は顕微解剖された癌7番、1542-CP₃TXの後期継代およびその派生クローンのパターンと同じLOHのパターンを示し、後期継代大量培養中の多くを占める癌クローンは明らかに非常に初期の培養継代に存在したことが示唆された。興味深いことに、初期継代1542-CP₃TX由来のクローン1（1542-CP₃TX.8.1）は他の8つの初期継代クローンについて観察されたのとは異なるLOHパターンを示し、D8S133、D8S136およびD8S131の下部対立遺伝子の欠失が伴った。このことは、再び、2つの顕微解剖された癌（1番および3番）において検出されたLOHパターンと一致している。注意すべきは、患者1542由来の初期および後期継代の不死化培養正常前立腺上皮、精嚢、または繊維芽細胞を用いた反復的実験ではLOHが検出されなかったことである。このことは癌から派生した細胞において観察されたLOHは培養によるアーティファクトであったという可能性に対する反証となる。

5つの残りの患者由来の培養細胞における染色体8p12-21のLOHの検査

患者1510および1512において、LOHは顕微解剖された癌標本中の多数の座位で検出された（表4）。しかし、対応する癌含有組織標本から生成された不死化上皮培養細胞は、初期または後期培養継代で大量レベルで試験された場合LOHを示さなかった。同様に、後期培養継代から成長したクローン（1510-CPTXについて

は継代23、1512-CPTXについては継代31）はLOHの証拠を示さなかった。このことは、これらの培養が生産されたものの組織標本にはかなりの量の正常前立腺上皮

が存在すること（表2）と、試験管内が正常細胞が過剰成長することを反映している。非常に初期の培養継代でこれらの細胞系列をクローニングすることがより多くの価値ある結果を生む可能性がある。

患者1519（1フォーカス）および1532（8フォーカス）由来の顕微解剖された癌フォーカスの検査はLOHを示さなかった（表4）。それにもかかわらず、これらの腫瘍から確立された培養細胞をLOHについて評価した。患者1519の場合は、大量培養1519-CPTXの検査から、検査された6つの情報座位で異型接合性の保持が示された。しかし、培養継代24由来の11の単細胞クローンのうち1つが単一の座位D8S133でLOHを示した。患者1532の場合は、獲得された2つの癌標本のうち一つから生成された大量培養系列1532-CP₂TX（表2）が長時間の培養後のみ（継代24）にかぎってD8S133、D8S136およびNEFLにおいてLOHを示した。後期培養継代から生成された10クローンすべても同じ欠失パターンを示した。しかし、患者1532由来の正常前立腺組織由来の不死化培養細胞の1つは20培養継代後にもLOHの証拠を示さなかった。同様に、自己由来の不死化繊維芽細胞系列は1532-CP₂TXで失われたのと同じ3つの対立遺伝子における異型接合性を保持した。即ち、単一の1519-CPTXクローンおよび1532-CP₂TXで観察されたLOHから、これらの結果が分析のために解剖されなかった生体内 (in situ) 腫瘍フォーカスに存在するLOHを反映し得ることが示唆される。

患者1535由来の培養細胞で興味深い結果が得られた。この場合、広範なLOHが6つの別々の顕微解剖された癌フォーカスにおいて示され、全てが同じパターンの欠失を示した（表4）。前立腺腫瘍から生成された初期および後期継代の培養細胞は、正常前立腺由来および正常精嚢由来のものと同様、LOHを示さなかった。同様に、培養継代27で生成された11の癌クローンは欠失を示さなかった。しかし初期継代癌培養（継代12）のクローニングによって、6つの顕微解剖された癌病巣と合うLOHパターンを持つ一つのクローンが明らかになった（クローン1535-CP₁TX.14.3）。これらの結果は、患者1542で観察された結果を再現しており、純粋な癌培養細胞を得るためには組織学的に異質な前立腺腫瘍標本から生成した不死化培養細胞の初期クローニングが必要であることを示している。

前立腺腫瘍由来の不死化細胞系列によるMHC分子の発現

不死化癌由来細胞系列における表面MHCの発現の検査は、免疫学的研究のためこれらの系列の潜在的有用性を考慮するために重要である。6患者全てに由来する培養は、フローサイトメトリーで決定したところ有意量の表面MHC class Iと接着分子ICAM-1を発現した(表6)。

表6：不死化前立腺上皮細胞系列によるMHCおよび接着分子の細胞表面での発現

患者番号	細胞原	%陽性細胞		
		MHC classI	MHCclassII	ICAM-1
1510	F	96	1	57
	CP	90	2	22
1512	NP	100	10	43
	CP	97	6	35
1519	CP	92	3	40
1532	NP	88	1	50
	CP ₁	89	4	65
	CP ₂	95	1	74
1535	NP	78	0	44
	SV	96	1	80
	CP ₁	99	1	60
	CP ₂	82	1	50
1542	F	87	1	58
	NP	63	2	65
	SV	69	1	87
	CP ₁	71	1	66
	CP ₂	72	1	73
	CP ₃	40	3	64

不死化された系列のいかなるものも、MHC class IIまたはB7ファミリーの共刺激分子(B7.1、B7.2)のどちらも検出可能なレベルでは発現しなかった。しかし以前にメラノーマ細胞系列で報告されたように(29)、MHC分子の発現がIFN- γ

の存在下で上流制御されることができかどうかを決定することは興味深い。細胞系列1532-CP₂TX、1535-CP₁TXおよび1542-CP₃TX由来の不死化された癌を500U/ml IFN- γ の存在下で72時間培養し、その後MHCの発現を検査した。全てが有意量のMHC class II分子の発現を誘導された。さらに処理されていない対照と比較した場合、MHC class I分子の発現も増強されていた（図5Cと5Aの比較）。このことに照らし、これらの不死化癌由来細胞系列は、前立腺一次悪性腫瘍の患者におけるCD4+およびCD8+細胞媒介性免疫応答の研究または刺激のために潜在的に有益な試薬の一つである。

前立腺上皮細胞系列のHLA型決定

前立腺上皮細胞系列が由来する個々の患者についてHLA型決定を行った。A、B、C型は当該技術分野で既知の方法を用いたリンパ球の血清型決定によって決定された。DRおよびDQ型は標準的な方法を用いたリンパ球の遺伝子型決定により決定された。HLA型の結果は表7に示されている。

表7

前立腺上皮細胞系列のHLA型

患者番号	A	B	Cw	DRB1*	DQB1*	DRB
1510	29, 31	44, 60	3, -	0401, 07	0201, 0302	4* 0101
1512	3, -	7, -	7, -	1501, -	0602, -	5* 0101
1519	24, 32	14, 44	5, 8	0701, 1301	0201, 0603	3* 0101 4* 0101
1532	1, -	8, 57	6, 7	0301, 04	0201, 0301	3* 0101 4* 0101
1535	1, 31	7, 37	6, 7	07, 04	0201, 0302	4* 0101
1542	1, 23	50, 70	2, -	0301, 1101	0201, 0301	3* 0202

文献リスト

1. Parker, S.L., Tong, T., Bolden, S., and Wingo, P.A. Cancer Statistics, 1996. CA Cancer J. Clin, 65:5-27, 1996.
2. Isaacs, J.T., Isaacs, W.B., and Schalken, J. Comparative aspects of

- f multistep prostatic carcinogenesis in humans and rodents. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 376:261-288, 1992.
3. Webber, M.M., Chaproniere-Rickenberg, D.M., and Donohue, R.E. Isolation and growth of adult human prostatic epithelium in serum-free, defined medium. In: *Methods for serum-free culture of cells of the endocrine system*, pp. 47-61. New York: Alan R. Liss, 1984.
 4. Peehl, D.M. Culture of human prostatic epithelial cells. In: *Culture of epithelial cells*, pp. 159-180. New York: Wiley-Liss, 1992.
 5. Rhim, J.S., Webber, M.M., Bello, D., Lee, M.S., Amstein, P., Chen, L., and Jay, G. Stepwise immortalization and transformation of adult human prostate epithelial cells by combination of HPV-18 and v-Ki-ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11874-11878, 1994.
 6. Bondou, P., Cussenot, O., Soliman, H., Villette, J.M., Teillac, P., LeDuc, A., and Fiet, J. Distinct androgen 5 alpha-reduction pathways in cultured fibroblasts and immortalized epithelial cells from normal human adult prostate. *J. Urol.*, 152:226-231, 1994.
 7. Lee, M., Garkovenko, E., Yun, J.S., Weijerman, P.C., Peehl, D.M., Chen, L., and Rhim, J.S. Characterization of adult human prostatic epithelial cells immortalized by polybrene-induced DNA transfection with a plasmid containing an origin-defective SV40 genome. *Int. J. Oncol.*, 4:821-830, 1994.
 8. Weijerman, P.C., Koenig J.J., Wong, S.T., Niesters, G.M., and Peehl, D.M. Lipofection-mediated immortalization of human prostatic epithelial cells of normal and malignant origin using human papillomavirus type 18 DNA. *Cancer Res.*, 54:5579-5583, 1994.
 9. Brothman, A.R., Peehl, D.M., Patel, A.M., and McNeal, J.E. Frequency and pattern of karyotypic abnormalities in human prostate cancer. *Cancer Res.*, 50:3795-3803, 1990.

10. Brothman, A.R., Peehl, D.M., Patel, A.M., MacDonald, G.R., McNeal, J.E., Ladaga, L.E., and Schellhammer, P.F. Cytogenetic evaluation of 20 cultured primary prostatic tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 55:79-84, 1991.
11. Brothman, A.R., Patel, A.M., Peehl, D.M., and Schellhammer, P.F. Analysis of prostatic tumor cultures using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Cancer Genet. Cytogenet.*, 62:180-185, 1992.
12. Isaacs, W.B., Bova, G.S., Morton, R.A., Bussemakers, J.D., and Ewing, C.M. Molecular biology of prostate cancer. *Seminars in Oncology*, 21: 514-521, 1994.
13. Carter, B.S., Ewing, C.M., Ward, W.S., Treiger, B.F., Aalders, T.W., Schalken, J.A., Epstein, J.I., and Isaacs, W.B. Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8751-8755, 1990.
14. Bergenheim, U.S.R., Kunimi, K., Collins, V.P., and Ekman, P. Deletion mapping of chromosomes 8, 10, and 16 in human prostatic carcinoma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 3:215-220, 1991.
15. Sakar, W.A., Macoska, J.A., Benson, P., Grignon, D.J., Wolman, S.R., Pontes, J.E., and Crissman, J.D. Allelic loss in locally metastatic, multisampled prostate cancer. *Cancer Res.*, 54:3273-3277, 1994.
16. Bova, G.S., Carter, B.S., Bussemakers, M.J.G., Emi, M., Fujiwara, Y., Kyprianou, N., Jacobs, S.C., Robinson, J.C., Epstein, J.I., Walsh, P.C., and Isaacs, W.B. Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res.*, 53:3869-3873, 1993.
17. Trapman, J., Sleddens, H.F.B.M., van der Weiden, M.M., Dinjens, W.N.M., Konig, J.J., Schroder, F.H., Faber, P.W., and Bosman, F.T. Loss of heterozygosity of chromosome 8 microsatellite loci implicates a candidate

e tumor suppressor gene between the loci D8S87 and D8S133 in human prostate cancer. *Cancer Res.*, 54:6061-6064, 1994.

18. Macoska, J.A., Trybus, T.M., Benson, P.D., Sakr, W.A., Grignon, D.J., Wojno, K.D., Pietruk, T., and Powell, I.J. Evidence for three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer. *Cancer Res.*, 55:5390-5395, 1995.

19. Vocke, C.D., Pozzatti, R.O., Bostwick, D.G., Florence, C.D., Jennings, S.B., Strup, S.E., Duray, P.H., Liotta, L.A., Emmert-Buck, M.R., and Linehan, W.M. Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res.*, 56:2411-2416, 1996.

20. Emmert-Buck, M.R., Vocke, C.D., Pozzatti, R.O., Duray, P.H., Jennings, S.B., Florence, C.D., Zhuang, Z., Bostwick, D.G., Liotta, L.A., and Linehan, W.M. Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res.*, 55:2959-2962, 1995.

21. Topalian, S.L., Muul, L.M., Solomon, D., and Rosenberg, S.A. Expansion of human infiltrating lymphocytes for use in immunotherapy trials. *J. Immunol. Meth.*, 102:127-141, 1987.

22. Halbert, C.L., Demers, G.W., and Galloway, D.A. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.*, 65:473-478, 1991.

23. Topalian, S.L., Solomon, D., Avis, F.P., Chang, A.E., Freerksen, D.L., Linehan, W.M., Lotze, M.T., Robertson, C.N., Seipp, C.A., Simon, P., Simpson, C.G., and Rosenberg, S.A. Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: A pilot study. *J. Clin. Oncol.*, 6:839-853, 1988.

24. Emmert-Buck, M.R., Roth, M.J., Zhuang, Z., Campo, E., Rozhin, J., Sloane, B.F., Liotta, L.A., Stetler-Stevenson, W.G. Increased gelatin

se A and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples. *Am. J. Pathol.*, 154:1285-1290, 1994.

25. Zhuang, Z., Berttheau, P., Emmert-Buck, M.R., Liotta, L.A., Gnarr a. J., Linehan, W.M., Lubensky, I.A. A new microdissection technique for archival DNA analysis of specific cell populations in lesions less than one millimeter. *Am. J. Pathol.*, 146:620-625, 1995.

26. Zhuang, Z., Merino, M.J., Chuaqui, R., Liotta, L.A., and Emmert-Buck, M.R. Identical allelic loss on chromosome 11q13 in microdissected in situ and invasive human breast cancer. *Cancer Res.*, 55:467-471, 1995.

27. Hung, T., Mak, K., and Fong, K.A. A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.*, 18:4953, 1990.

28. Litt, M., Hauge, X., and Sharma, V. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. *Biotechniques*, 15:280-284, 1993.

29. Markus, N.R., Rosenberg, S.A., and Topalian, S.L. Analysis of cytokine secretion by melanoma-specific CD4+T lymphocytes. *J. Interferon Cytokine Res.*, 15:739-746, 1995.

30. Burrows, M.T., Burns, J.E., and Suzuki, Y. Studies on the growth of cells. The cultivation of bladder and prostatic tumors outside the body. *J. Urol.* 1:3, 1917.

31. Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., and Murphy, G.P. LNCaP model of prostatic carcinoma. *Cancer Res.*, 43:1809-1818, 1983.

32. Henttu, P., Liao, S., and Vihko, P. Androgens up-regulate the human prostate specific antigen messenger ribonucleic acid (mRNA) but down

-regulate the prostatic acid phosphatase mRNA in the LNCaP cell line. *Endocrinology*, 130:766-772, 1992.

33. Cooney, E.L. et al 1991 Lancet Vol. 337:567.
34. Wolff, J.A. et al 1990 Science Vol. 247:1465.
35. Davis, H.L. et al 1993 Hum, Gene Ther, Vol. 4:151.
36. Yang, N.S. et al 1990 Proc, Natl. Acad, Sci USA Vol. 87:9568.
37. Williams, R.S. et al 1991 Proc, Nat'l-Acad, Sci USA Vol. 88:2726
38. Fynan, E.R. et al 1995 Proc, Natl. Acad, Sci USA Vol. 90:11478.
39. Eisenbraun, M.D. et al 1993 DNA and Cell Biol, Vol. 12:791.
40. Fuller, D.H. et al 1994 AIDS Res, Hum. Retrovir. Vol 10(11):1433
41. Acsadi, G. et al 1991 Nature Vol. 352:815.
42. Matteucci, M.D. et al 1996, Nature vol. 384:20-22.
43. Perkus et al Science 1985 Vol. 229:981-984.
44. Kaufman et al Int, J. Cancer 1991, Vol. 48:900-907.
45. Moss Science 1991 Vol. 252:1662.
46. Smith and Moss BioTechniques Nov/Dec 1984, p. 306-312.
47. U.S. Patent No. 4,738,846.
48. Sutter and Moss Proc, Nat'l Acad. Sci USA 1992 Vol.89:10847-10851
49. Baxby and Paoletti Vaccine 1992 Vol. 10:8-9.
50. PCT International Publication No. W094/16716 published August 4, 1994.
51. Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed. F. Ausubel et al, eds. John Wiley & Son, Inc., 1995.
52. Basic Methods in Molecular Biology, 2nd ed. L. Davis et al, eds. Appleton & Lange, 1994.

配列表

(2) 配列情報 SEQ ID NO:1:

(i) 配列の特性:

- (A)長さ: 19塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:1:

GAGCCCAGAC AGGCTGGAA

19

(3) 配列情報 SEQ ID NO:2:

(i) 配列の特性:

- (A)長さ: 21塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:2:

ACTTTTCTGG CCAAACCTCT G

21

(4) 配列情報 SEQ ID NO:3:

(i) 配列の特性:

- (A)長さ: 20塩基対
- (B)型: 核酸
- (C)鎖の数: 一本鎖
- (D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:3:

CAGGTGGGAA AACTGAGGGA

20

(5) 配列情報 SEQ ID NO:4:

(i) 配列の特性:

- (A)長さ: 22塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:4:

AGCAACTGTC AACATATTGC TC

22

(6) 配列情報 SEQ ID NO:5:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 19塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:5:

GCCCAAAGAG GAGAATAAA

19

(7) 配列情報 SEQ ID NO:6:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 18塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:6:

CTGTTTCCAC ACCGAAGC

18

(8) 配列情報 SEQ ID NO:7:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 20塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:7:

GCAGTAGTGC CGCAGTTTCA

20

(9) 配列情報 SEQ ID NO:8:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 20塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:8:

TGCAATTCAT CTCCTTCT

20

(10)配列情報 SEQ ID NO:9:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 22塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:9:

AAATACCGAG ACTCACACTA TA

22

(11)配列情報 SEQ ID NO:10:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 21塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:10:

GCTAATCAGG GAATCACCCA A

21

(12)配列情報 SEQ ID NO:11:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 22塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:11:

ACATAGGCTG GAGAGTCACA GG

22

(13)配列情報 SEQ ID NO:12:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 22塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:12:

GGATGAGGCT CAGCACACAA GC

22

(14)配列情報 SEQ ID NO:13:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 18塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:13:

TAGATGTTAC CATTTCAC

18

(15)配列情報 SEQ ID NO:14:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 18塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:14:

GATTAGATCT TGGATCAG

18

(16)配列情報 SEQ ID NO:15:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 20塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列: SEQ ID NO:15:

TCCCAGATCG CTCTACATGA

20

(17)配列情報 SEQ ID NO:16:

(i) 配列の特性:

(A)長さ: 20塩基対

(B)型: 核酸

(C)鎖の数: 一本鎖

(D)トポロジー: 直鎖状

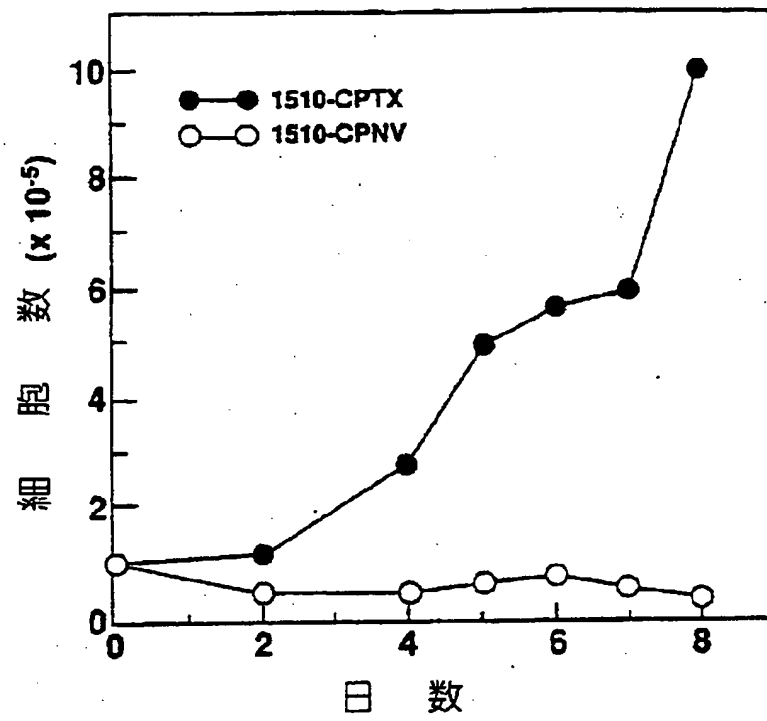
(ii) 配列: SEQ ID NO:16:

CACAGCTTCA GAAGTCACAG

20

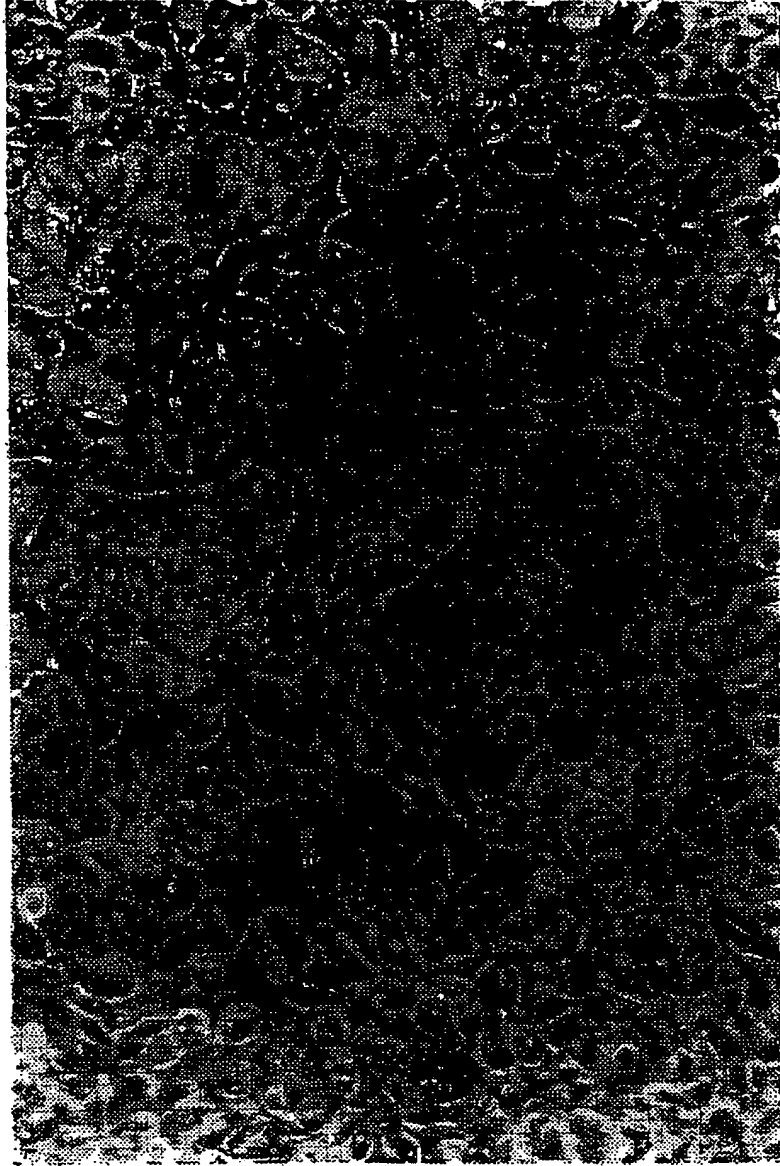
【図1】

FIGURE 1A



【図1】

FIG. 1B



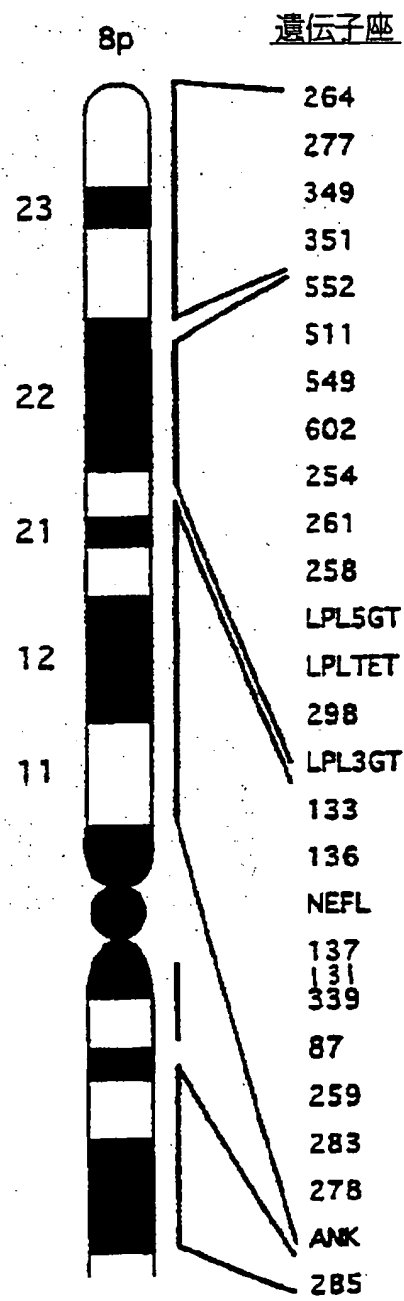
【図2】

FIG. 2



【図3】

FIGURE 3

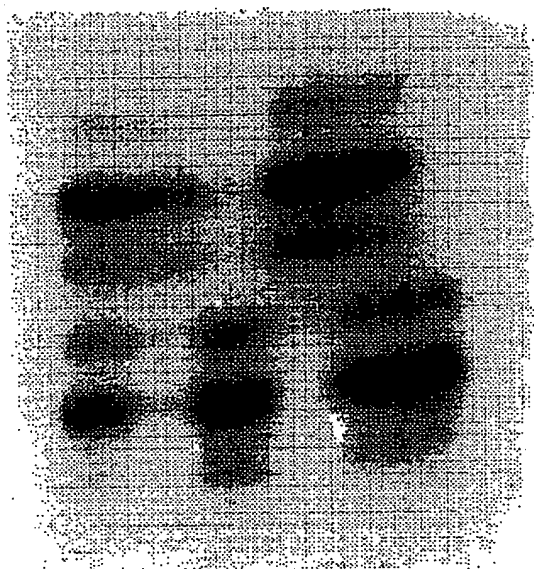


【図4】

FIG. 4

D8S136

1 2 3 4 5 6



【图5】

FIG. 5A

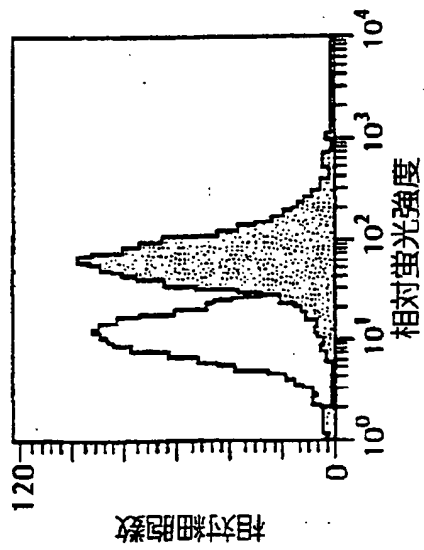


FIG. 5C

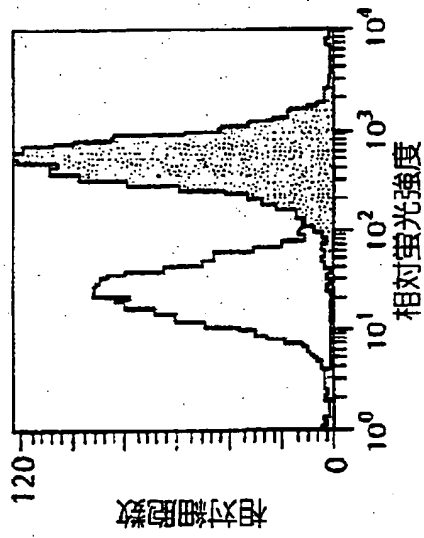


FIG. 5E

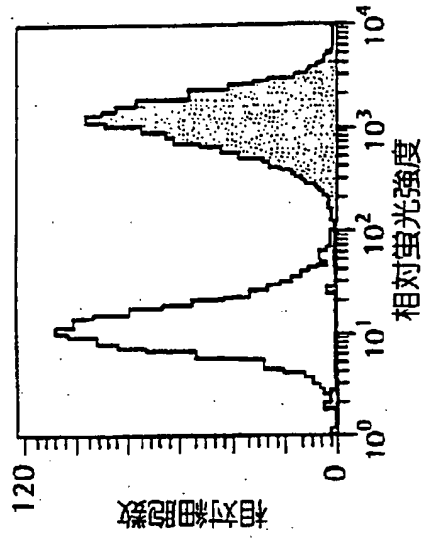


FIG. 5B

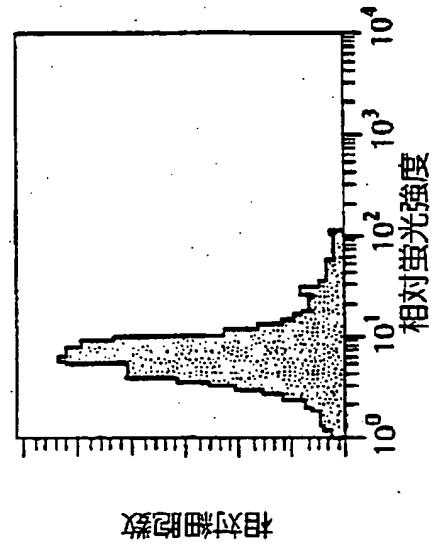


FIG. 5D

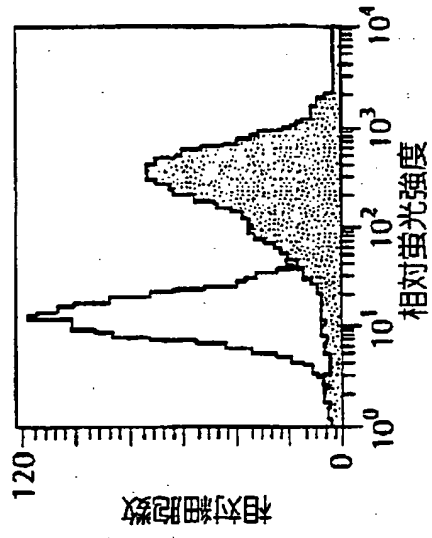
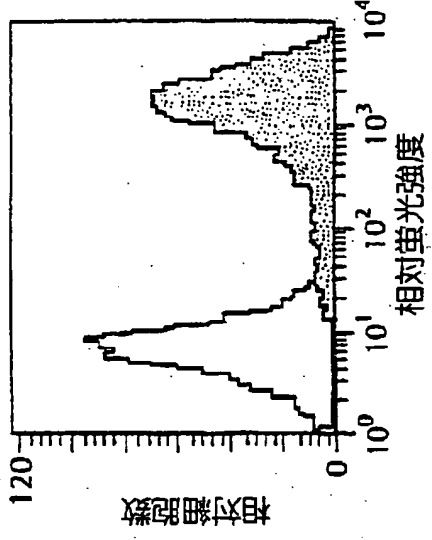


FIG. 5F



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Natl. Application No.
PC/US 97/01430

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N5/10 A61K35/48 C07K16/18 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CANCER RESEARCH, vol. 54, 1 November 1994, pages 5579-5583, XP002030997 WEIJERMAN ET AL: "LIPOFECTION-MEDIATED IMMORTALIZATION OF HUMAN PROSTATIC EPITHELIAL CELLS OF NORMAL AND MALIGNANT ORIGIN USING HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 DNA" cited in the application see the whole document ---	1,23, 27-40
A	CANCER RESEARCH, vol. 55, 15 July 1995, pages 2959-2962, XP002030998 ENMERT-BUCK ET AL: "ALLELIC LOSS ON CHROMOSOME 8P12-21 IN MICRODISSECTED PROSTATIC INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA" cited in the application ---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 May 1997

Date of mailing of the international search report

27.05.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sitch, W

International Application No.

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 95 29994 A (UNIV MICHIGAN ;US HEALTH (US)) 9 November 1995 see page 5, line 12 - line 27 ---</p>	
A	<p>WO 95 29990 A (UNIV MICHIGAN ;US HEALTH (US)) 9 November 1995 see page 3, line 30 - page 4, line 12 -----</p>	

フロントページの続き

- (72)発明者 ラインハン, ダブリュー・マーストン
アメリカ合衆国メリーランド州20852, ノ
ース・ベセスダ, ティルデン・レーン
7009
- (72)発明者 ブライト, ロバート・ケイ
アメリカ合衆国メリーランド州20874, ジ
ャーマンタウン, ファーロング・ウェイ
14163
- (72)発明者 ヴォックケ, キャシー・ディー
アメリカ合衆国メリーランド州20874, ジ
ャーマンタウン, ゴルフ・コース・ドライ
ブ 20533

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.